

ZUR WIRKUNG VERSCHIEDENER HEMMSTOFFE
DES BC_1 - SEGMENTS DER ATMUNGSKETTE
AUF WILDTYPE UND RESISTENZMUTANTEN
VON *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* UND
SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE

Bernd Lang

1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555611_0060

1. Gutachter: Prof.Dr.F.Kaudewitz

2. Gutachter: Priv.Doiz.Dr.W.Bandlow

Tag der mündlichen Prüfung: 17.11.1977

Aus dem Genetischen Institut der Universität München

Lehrstuhlinhaber: Prof. Dr. F. Kaudewitz

ZUR WIRKUNG VERSCHIEDENER HEMMSTOFFE DES
BC₁-SEGMENTS DER ATMUNGSKETTE AUF WILDTYP
UND RESISTENZMUTANTEN VON SACCHAROMYCES
CEREVISIAE UND SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Biologie
der Ludwig-Maximilian-Universität München

vorgelegt von Bernd Lang
München, 1977



Die vorliegende Arbeit wurde von 1972 bis 1976 im Genetischen Institut der Universität München unter Anleitung von Prof. Dr. Kaudewitz und*Doz. Dr. Bandlow durchgeführt.

Auf Grund der Aktualität des Themas, an welchem mehrere in- und ausländische Gruppen arbeiten, wurden mit Genehmigung des Fachbereichs Biologie Teilergebnisse dieser Dissertation bereits veröffentlicht:

Lang, B., Burger, G. und Bandlow, W. (1974)

"Activity of reduced ubiquinone: cytochrome c oxidoreductase with various ubiquinol - isoprenologues as substrate and corresponding inhibitory effect of antimycin in yeast".

Biochim. Biophys. Acta 368, 71 - 85

Burger, G., Lang, B., Bandlow, W. und Kaudewitz, F. (1975)

"Studies on the mechanism of electron transport in the bc₁ - segment of the respiratory chain in yeast.
II. The binding of antimycin to mitochondrial particles and the function of two different binding sites."

Biochim. Biophys. Acta 396, 189 - 201

Lang, B., Burger, G., Wolf, K., Bandlow, W. und Kaudewitz, F. (1975)

"Studies on the mechanism of electron transport in the bc₁ - segment of the respiratory chain in yeast.
III. Isolation and characterization of an antimycin resistant mutant A N T 8 in Schizosaccharomyces pombe."

Molec. Gen. Genet. 137, 353 - 363

Burger, G. und Lang, B. (1975)

"The inhibitory effect of antimycin in an antimycin resistant mutant of Schizosaccharomyces pombe."

Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 224

Lang, B. und Burger, G. (1975)

"The binding of antimycin to mitochondrial particles and its effects on cytochrome b reduction in an antimycin resistant mutant of Schizosaccharomyces pombe."

Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 248

Wolf, K., Burger, G., Lang, B. und Kaudewitz, F. (1976)

"Extrachromosomal inheritance in Schizosaccharomyces pombe.
I. Evidence for an extrakaryotically inherited mutation conferring resistance to antimycin."

Molec. Gen. Genet. 144, 67 - 73

Wolf, K., Lang, B., Burger, G. und Kaudewitz, F. (1976)

"Extrachromosomal inheritance in Schizosaccharomyces pombe.
II. Evidence for extrakaryotically inherited respiratory deficient mutations."

Molec. Gen. Genet. 144, 75 - 81

Burger, G., Lang, B., Wolf, K., Bandlow, W. und Kaudewitz, F. (1976)

"The inhibitory effect of HQNO compared with extra-reduction and binding in the wild-type and in an antimycin resistant mutant, ANT^R 8, in Schizosaccharomyces pombe."

In "Genetics, Biogenesis and Bioenergetics of Mitochondria",

Bandlow et al. (eds.), Seite 399 - 407

Walter de Gruyter, Berlin, New York

Lang, B., Burger, G., Wolf, K., Bandlow, W. und Kaudewitz, F. (1976)

"Characterization of respiratory-deficient and antimycin resistant mutants of Schizosaccharomyces pombe with extrachromosomal inheritance".

In: "Genetics, Biogenesis and Bioenergetics of Mitochondria", Bandlow et al. (eds.), Seite 379 - 387, Walter de Gruyter, Berlin, New York

Lang, B. und Burger, G. (1975)

"Inhibition of NADH oxidase by succinate in an antimycin resistant mutant of Schizosaccharomyces pombe."

10. FEBS-meeting, Paris; Abstract Nr. 1215

Wolf, K., Seitz, G., Lang, B., Burger, G. und Kaudewitz, F. (1976)

"Extrachromosomal inheritance of drug resistance and respiratory deficiency in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe."

In "Genetics, Biogenesis and Bioenergetics of Mitochondria", Bandlow et al. (eds.), Seite 23 - 37
Walter de Gruyter, Berlin, New York

Lang, B., Burger, G., Doxiadis, I., Thomas, D.Y.T.,

Bandlow, W. und Kaudewitz, F. (1977)

"A simple method for the large-scale preparation of mitochondria from microorganisms".

Analyt. Biochem. 77, 110 - 121

Burger, G., Lang, B., Bandlow, W., Schweyen, R.J.,

Backhaus, B. und Kaudewitz, F. (1976)

"Antimycin resistance in Saccharomyces cerevisiae."

Biochem. Biophys. Res. Commun. 72, 1201

Lang, B., Burger, G., Bandlow, W., Kaudewitz, F. und
Schweyen, R.J. (1976)

"Antimycin- and funiculosin-resistant mutants in
Saccharomyces cerevisiae."

In "Biogenesis of chloroplasts and mitochondria",
(Bücher, T. et al. eds.)

ASP Biological and Medical Press B. V., Amsterdam, im Druck

Herrn Prof. Dr. Kaudewitz und Herrn Doz. Dr. Bandlow danke ich für die Aufgabenstellung und die Betreuung meiner Dissertation. Auf Grund vieler Anregungen, Diskussionen und praktischer Hilfestellungen sowie der grosszügigen Bereitstellung der modernsten wissenschaftlichen Geräte war es für mich stets eine Freude, in diesem Institut wissenschaftlich zu arbeiten.

Die Kooperation mit Dr. Burger, Dr. Schweyen, Dr. Wolf, Dr. Thomas und I. Doxiadis hat mir die praktische Durchführung meiner Arbeit sehr erleichtert. Für die zahlreichen Diskussionen über genetische Fragestellungen und für die Bereitstellung von geeigneten Hefestämmen für diese Untersuchungen bin ich insbesondere Dr. Wolf und Dr. Schweyen verpflichtet.

Der regelmässige Kontakt mit Herrn Dr. von Jagow und Dr. Kröger (München) hat mir für die Interpretation der biochemischen Ergebnisse viele Denkanstösse ergeben. Herrn Dr. Goffeau (Brüssel), Herrn Dr. Berden und Herrn Dr. Grimmelikhuijzen (Amsterdam) danke ich ebenfalls für die Diskussion und ihr Interesse an den Ergebnissen meiner Arbeit.

Herrn Manhart danke ich für die bereitwillige Unterstützung bei der Entwicklung neuer spektroskopischer Untersuchungsmethoden und Fräulein Dörr für die wertvolle Hilfe bei der Durchführung von Experimenten.

Die Universität München ermöglichte durch Gewährung eines Graduierten-Stipendiums eine zügige Bearbeitung meiner Aufgabenstellung.

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	9
II.	MATERIAL UND METHODEN	14
	1.) Hefestämme und Nomenklatur	14
	2.) Chemikalien und Abkürzungen	15
	3.) Medien, Wachstumsexperimente, Hefezüchtung und Mitochondrienpräparation	16
	4.) Mutantenisolation und genetische Analyse	16
	5.) Enzymatische Tests	18
	6.) Tieftemperatur-Spektroskopie	19
	7.) Raumtemperatur-Spektroskopie	19
	8.) Bindung von HQNO an oxidierte mitochondriale Partikel	19
	9.) Berechnung von Hemmkurven aus Bindungsparametern	20
	10.) Proteinbestimmung	21
III.	ERGEBNISSE	22
	1. Untersuchungen an <u>Schizosaccharomyces pombe</u> Wildtyp und <u>ana^r - 8</u>	22
	a.) Wirkung von HQNO und Antimycin	22
	b.) Wirkung von Funiculosin	35
	c.) Wirkung von Dibucain	39
	d.) Doppelsubstratspektren	48
	2.) Vergleich des Wildtyps von <u>S. c.</u> und <u>Sch. p.</u>	53
	a.) Wirkung von Antimycin	53
	b.) Wirkung von Funiculosin	53
	3.) Vergleich des Wildtyps mit einigen Mutanten von <u>S. c.</u> , die gegen Hemmstoffe des <u>bc₁</u> -Segments resistent sind	54
	a.) Charakterisierung der Mutante <u>ana^r - 101</u>	54
	b.) Charakterisierung der Mutante <u>fun^r - 202</u>	60
	c.) Charakterisierung der Mutante <u>mik^r - 1</u>	61

4.)	Genetische Untersuchungen der Resistenzmutanten von S. c.	64
a.)	Nachweis der mitochondrialen Vererbung der Mutation ana^r - 101	64
b.)	Genetische Lokalisation der Mutation fun^r - 202 und mik^r - 1 auf dem mitochondrialen Genom	66
IV.	DISKUSSION	67
1.)	Die Wirkungsweise von Dibucain, HQNO, Funiculosin und Antimycin bei <u>Sch. p.</u> Wildtyp und <u>S. c.</u> Wildtyp	67
a.)	Dibucain	71
b.)	HQNO	73
c.)	Funiculosin und Antimycin	75
d.)	Kompetitive Wirkung von Ubichinon und Hemmstoffen des <u>bc_1</u> - Segments der Atmungskette	76
2.)	Genetische und biochemische Charakterisierung der Mutanten	78
V.	ZUSAMMENFASSUNG	81
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	88
VII.	ANHANG	94

EINLEITUNG

Die Atmungskette von Eukaryonten besteht aus einer Vielzahl verschiedenartiger Komponenten wie Flavoproteinen, Nichthämeiseproteinen, Hämoproteinen, Ubichinon, "Core"-Protein und Kupferproteinen usw. (1, 2). Da alle Komponenten in der inneren Mitochondrienmembran eingebettet sind, ermöglicht diese Fixierung strukturell festgelegte Beziehungen zwischen den beteiligten Enzymen. Andererseits behindert oder unterbindet gerade diese räumliche Anordnung energetisch mögliche Wechselwirkungen. In der intakten Atmungskette z. B. ist kein Elektronentransfer zwischen den Dehydrogenasen und dem bc_1 -Segment möglich, wenn der diffundible Überträger Ubichinon entfernt wurde (3-5).

Die Schwierigkeit der biochemischen Erforschung der Atmungskette liegt also nicht nur in der grossen Anzahl der beteiligten Komponenten; Sowohl deren komplexe funktionelle Beziehungen als auch die Tatsache, dass die Funktion der Einzelkomponenten von der strukturellen Umgebung abhängt, erschweren den Einblick in dieses Enzymsystem.

Es kommt hinzu, dass die Bausteine der inneren Mitochondrienmembran von dem cytosolischen wie auch dem mitochondrialen Proteinsynthesystem geliefert werden. Die Biogenese funktionsfähiger Mitochondrien erfordert somit das Zusammenwirken verschiedener Regulationssysteme. Ausfälle einzelner Komponenten der Mitochondrienmembran (z. B. in atmungsdefekten Mutanten) können auf diese Weise sekundäre Störungen nach sich ziehen, welche die Erforschung primärer Defekte erschweren oder praktisch unmöglich machen. (S. z. B. die pleiotropen Ausfälle von Cytochrom b_{566} und Cytochrom a_{607} in mitochondrialen Defektmutanten (6).)

Trotz einiger Jahrzehnte intensiver Arbeit etlicher Laboratorien ist bisher nicht eindeutig geklärt, wieviele b-Cytochrome in den Mito-

chondrien der am besten untersuchten Versuchsobjekte wie Rinderherz, Taubenherz u.ä. existieren. Noch weniger weiss man darüber bei Pilzen oder höheren Pflanzen (vgl. z.B. 7 - 14). Die Vielzahl widersprüchlicher Ergebnisse und Theorien, die über Struktur und Funktion des bc_1 -Segments der Atmungskette publiziert wurden (cf. 7 - 24), deutet an, wie unvollkommen der Kenntnisstand auf diesem Gebiet noch ist. Dies beruht möglicherweise weniger auf dem Fehlen adäquater biochemischer Methoden, als auf der mangelhaften Berücksichtigung vergleichender genetischer Untersuchungen. Veröffentlichungen über funktionale Unterschiede in der mitochondrialen Atmungskette verschiedener Eukaryonten (2, 3, 25, 26) oder über Mutanten mit geringfügig veränderten Enzymkomplexen (z.B. mitochondriale Resistenz- oder Punktmutanten) sind vergleichsweise selten (6, 16, 20, 27 - 32). Die Grundlagen für allgemeingültige Modelle über Biogenese und Funktionsweise der mitochondrialen Atmungskette bei Eukaryonten müssen also erst noch erarbeitet werden.

Für eine genauere Befassung mit dem umrissenen Problemkreis bot sich die vergleichende Untersuchung neuer Hemmstoffe oder verschiedener Substratkombinationen für das bc_1 -Segment in unterschiedlichen Organismen an. Die Wahl von Mikroorganismen (Saccharomyces cerevisiae und Schizosaccharomyces pombe) als Versuchsobjekte ermöglichte zusätzlich die Anwendung genetischer Methoden: Durch Induktion und Selektion von Mutanten, die gegen bisher noch nicht angewendete Hemmstoffe der Atmungskette resistent sind, könnte neues Material für die Erweiterung des Verständnisses der Atmungskettenfunktion geschaffen werden. Die Isolation einer mitochondrial vererbten, Antimycin-resistenten Mutante bei Schizosaccharomyces pombe erwies sich als ein erster erfolgreicher Schritt in diese Richtung (16, 20, 27, 28). Desweiteren versprach die Kartierung der genannten Mutationen Erkenntnisse zur Frage nach der Kodierung einzelner Atmungskettenenzyme in Kern- oder mitochondrialer DNS.

Dass die Objektwahl zugunsten der beiden Hefen Schizosaccharomyces pombe und Saccharomyces cerevisiae ausfiel, basiert auf einer Reihe von Vorzügen, die aus einem Vergleich dieser Organismen erkennbar werden. Einmal sind sie physiologisch wie morphologisch sehr verschieden: Saccharomyces cerevisiae ist petite-positiv, hat eine mitochondriale DNS von ca. 25μ (Schizosaccharomyces pombe ca. 8μ) Länge mit auffällig hohem AT-Gehalt (33, 34) und unterscheidet sich von Schizosaccharomyces pombe stark in den Absorptionsbanden der mitochondrialen Cytochrome (z. B. hat Saccharomyces cerevisiae zwei c-Typ-Cytochrome (35) mit je einer α -Absorptionsbande, während Schizosaccharomyces pombe nur ein Cytochrom c mit einer doppelten α -Absorptionsbande (36) besitzt).

Weitere gemeinsame Vorteile dieser Organismen sind, dass sie genetisch gut charakterisiert sind, dass Mutanten, verglichen mit höheren Pflanzen und Tieren, einfach herzustellen sind und nicht zuletzt, dass Mitochondrien mit hohen Atmungsaktivitäten in kurzer Zeit und in grossen Mengen zu präparieren sind (37) .

Ein sehr verallgemeinertes Modell der Atmungskette für Eukaryonten ist im folgenden (Abb. 1) dargestellt:

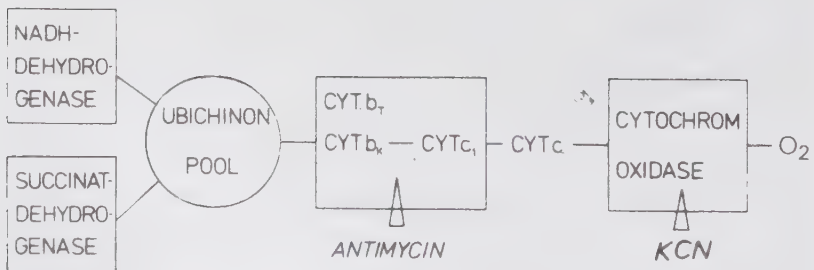


Abbildung 1: Modell des Elektronentransports der mitochondrialen Atmungskette

Die Elektronen werden von den Dehydrogenasen über einen diffundiblen Ubichinonpool (21) auf das $\underline{bc}_1$ -Segment übertragen. Für den Elektronenfluss von Ubichinon zu Cytochrom $\underline{c}$ ist Cytochrom $\underline{b}_T$ (= Cytochrom $\underline{b}_{566}$) entbehrlich (6, 38, 39).

Von Antimycin wird angenommen, dass es zwischen den b-Cytochromen und Cytochrom $\underline{c}_1$ den Elektronenfluss blockiert, dass also in Gegenwart von Antimycin alle b-Cytochrome durch NADH oder Succinat reduzierbar sind (7, 9).

Neuere Untersuchungen an Schizosaccharomyces pombe Wildtyp und einer Antimycin-resistenten Mutante (16, 20) widersprechen den oben dargestellten Verhältnissen zum einen bezüglich des Ubichinon-Wirkorts, da Ubichinonanaloge in der Antimycin-resistenten Mutante (in schwächerem Ausmass auch im Wildtyp) die Hemmwirkung von Antimycin aufheben. Offensichtlich existiert eine Kompetition zwischen Ubichinon und Antimycin. Zum anderen lässt sich auf Grund von Bindungsstudien auf zwei spezifische Hemmstellen des Antimycin bei diesem Organismus schliessen (10). Desweiteren ergeben spektroskopische Analysen der b-Cytochrome bei Schizosaccharomyces pombe, dass neben Cytochrom $\underline{b}_K$ und $\underline{b}_T$ eine zusätzliche b-Cytochrom-Komponente mit einer Absorptionsbande bei 553 - 554 nm (bei 77°K) existiert, die durch Ubichinol-3 reduzierbar ist (10). Auch im Gegensatz zu obigem Schema werden bei Schizosaccharomyces pombe die Cytochrome $\underline{b}_K$ und $\underline{b}_T$ mit Ubichinol-3 nur zu weniger als 10 % reduziert (10), obwohl die Ubichinol-3 : Cytochrom $\underline{c}$ - Oxidoreduktase zu mehr als 90% durch Antimycin hemmbar ist (40).

Ein Sachverhalt, der ebenfalls der in Abb. 1 gezeigten linearen Anordnung der Atmungskettenkomponenten im $\underline{bc}_1$ -Segment widerspricht, ist die sogenannte Extrareduktion. Wird einer anaeroben oder KCN-gehemmten und mit NADH- oder Succinat reduzierten Mitochondrien-

suspension Antimycin zugegeben, so ist zusätzliche Reduktion von b-Cytochromen (Extrareduktion) beobachtbar (1). Es besteht die Auffassung (cf. 13), dass durch das Substrat zunächst im wesentlichen Cytochrom b_K , nach Antimycineinwirkung zusätzlich Cytochrom b_T reduziert wird. Das Cytochromspektrum, das sich aus der Differenz zwischen den folgendermassen reduzierten Proben ermitteln lässt:

(NADH, bzw. Succinat, + KCN + Antimycin) - (NADH + KCN),
ist das Extrareduktionsspektrum für Antimycin und sollte nach der oben entwickelten Vorstellung das Spektrum von Cytochrom b_T darstellen (13). Welche Komponenten bei Schizosaccharomyces pombe nach Antimycinzugabe reduziert werden, wird im Ergebnisteil berichtet.

II. MATERIAL UND METHODEN

1.) Hefestämme und Nomenklatur

Die Symbole für genetische Marker und die Nomenklatur ist den Veröffentlichungen (42, 43) entsprechend gewählt. ANA^R/ANA^S und FUN^R/FUN^S sind allele Formen des Genorts für Antimycin- bzw. Funiculosin-Resistenz bzw. -Sensitivität. Folgende Stämme wurden verwendet:

a) Schizosaccharomyces pombe

- | | |
|-----------------------|--|
| 972 h ⁻ | : Wildtyp (Leupold, Bern) |
| 50 h ⁻ | : Adenin-auxotrophe Mutante |
| ana ^r - 8 | : Antimycin-resistente Mutante
(isoliert aus 50 h ⁻ (16)) |
| ana ^r - 14 | : Antimycin-resistente Mutante
(isoliert aus 50 h ⁻) |

b) Saccharomyces cerevisiae

- | | |
|------------------------|--|
| SM 11-6C | : Wildtyp (bezüglich der Funktion der mitochondrialen Atmungskette (42)) |
| ana ^r - 101 | : Antimycin-resistente Mutante (aus dem Stamm SM 11-6C isoliert) |
| fun ^r - 202 | : Funiculosin-resistente Mutante (aus dem Stamm SM 11-6 C isoliert) |
| mik ^r - 1 | : Mikamycin-resistente Mutante (isoliert von Trembath et al.(41)) |

Ausserdem die in Kreuzungsexperimenten verwendeten Stämme:

IL 993-5C (43)

BM-1421-9C (44)

SM 821-7C (42)

KL 58-2A (43)

cob^{ts} - 1282 und

oxi-4131 (45)

2.) Chemikalien und Abkürzungen

Erythromycin, NADH und Pferdeherz-Cytochrom c wurden von Boehringer, Antimycin von Nutritional Biochemical Corporation, 2-Heptyl-4-hydroxychinolin-N-oxid von Sigma, Dibucain von Ferak, Oligomycin von Serva, Paromomycin von Parke Davis und Urografin von Schering bezogen.

Funiculosin stellte freundlicherweise Herr Dr. Bollinger von der Sandoz AG, Basel, Ubichinon-Derivate Herr Dr. Solms von der Firma Hoffmann La Roche, Basel, FCCP Herr Dr. Heytler, Du Pont de Nemur, Wilmington und Chloramphenicol Fa. Bayer, Leverkusen zur Verfügung.

Folgende Abkürzungen werden verwendet:

SDS = Natrium Laurylsulfat

BSA = Rinderserumalbumin

FCCP = Carbonylcyanid-p-trifluormethoxyphenylhydrazon

NG = N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin

Q-1, Q-2, ... , Q-n = Ubichinon-1, Ubichinon-2, ... , -n
(n = Anzahl der Prenyleinheiten in
der Seitenkette des Ubichinon)

HQNO = 2-heptyl-4-hydroxychinolin-N-oxid

S.c. = *Saccharomyces cerevisiae*

Sch.p. = *Schizosaccharomyces pombe*

3.) Medien, Wachstumsexperimente, Hefezüchtung und Mitochondrienpräparation

Die Medien für die Kreuzungsexperimente bei S. c. (YPG, YPGD, YPG-C, YPG-E, YPG-O, YNB und YPG-P s. Tabelle I) sind in den Veröffentlichungen (42, 43) beschrieben. YPG-A und YPG-F wurden durch Zufügen von 5 - 20 nM Antimycin (abhängig von der Sensitivität der verwendeten Kreuzungspartner) bzw. 2 μ M Funiculosin + 20 μ g/ml SDS zu flüssigem YPG-Agar (ca. 60°C) kurz vor dem Giessen der Platten hergestellt.

Die Hefezüchtung im Fermenter (Chemap) und die Mitochondrienpräparation sind publiziert (37). Die Wachstumsraten verschiedener Hefestämme in Abhängigkeit von der Konzentration des verwendeten Hemmstoffes wurden durch Auszählen der Zellen in einer Blutzählkammer ermittelt.

Die Inhibitoren wurden den flüssigen und festen Wachstumsmedien als äthanolische Lösung zugegeben (2% Äthanol Endkonzentration).

4.) Mutantenisolation und genetische Analyse

Antimycin- und Funiculosin-resistente Mutanten wurden bei S. c. in dem Stamme SM 11-6C in folgender Weise erhalten: Zwanzig 10 ml - Proben mit je 5×10^7 /ml logarithmisch gewachsener Zellen wurden 30 Minuten mit 2 μ g/ml NG behandelt. Danach wurden die Zellen zweimal mit YPG gewaschen und in je 100 ml YPGD resuspendiert, dem 0.5 μ M Antimycin oder 1 μ M Funiculosin (beidesmal + 20 μ g/ml SDS) zugesetzt war. Die Kulturen wurden bei 30°C geschüttelt, bis ein Titer von 5×10^7 - 1×10^8 pro ml erreicht

Tabelle I

<u>S. c.</u>	<u>Abkürzung</u>	<u>Yeast Extrakt</u>	<u>Pepton</u>	<u>Glycerin</u>	<u>Dextrose</u>	<u>Hemmstoffe</u>	<u>Sonstiges</u>
YPG	1%	1%	3%	-	-	-	-
YPGD	1%	1%	3%	0.1%	-	-	-
YPG-A	1%	1%	3%	-	5-20 nM Antimycin	-	Für Agar- platten Zusatz von 1.5%
YPG-C	1%	1%	3%	-	4 mg/ml Chloramphenicol	50 nM Na ₂ KPO ₄ pH 6.2	Difco- Agar
YPG-E	1%	1%	3%	-	2 mg/ml Erythromycin	"	
YPG-O	1%	1%	3%	-	3 µg/ml Oligomycin	"	
YPG-P	1%	1%	3%	-	2.85 mg/ml Paromomycin- sulfat	"	
YPG-F	1%	1%	3%	-	2 µM Funi- culosin	"	
YNB	-	-	-	3%	-	0.65% Difco Yeast Nitro- gen Base ohne Aminosäuren (Minimal- medium)	
<u>Sch. p.</u>	YPG	1%	1%	5%	-	-	mit KH ₂ PO ₄ pH auf 5.8

war (in 2 von 10 Antimycin- und in allen 10 Funiculosin enthaltenden Kulturen nach 3 Tagen), um dann Aliquots auf Selektivmedien (YPG-A und YPG-F) auszustreichen. Je eine resistente Kolonie pro Ansatz, die innerhalb von 3 Tagen herangewachsen war, wurde isoliert und (durch mehrfach wiederholtes Ausstreichen auf Selektivmedium) gereinigt. In einem Kontrollexperiment ohne NG-Behandlung der Zellen traten keine Antimycin-resistenten und nur sehr selten Funiculosin-resistente Mutanten ($\text{ca. } 10^{-9}$) auf.

Die Mutanten wurden in YPG (50% Glycerin) bei -20°C konserviert. Die Auswertung der Freisporanalysen von Mehrfaktorkreuzungen ist in Veröffentlichungen (42, 43) beschrieben.

5.) Enzymatische Tests

Zur Messung der Oxidase-Aktivitäten wurde dem Testpuffer (0,08 M KH_2PO_4 , 25 mM Tris-Base, 1 mM EDTA pH 7,4) 0,1 mM oxidiertes Cytochrom c zugesetzt, um das während der Mitochondrienpräparation verlorengegangene Cytochrom c zu supplementieren. Die Ermittlung des Sauerstoffverbrauchs erfolgte in einem geschlossenen Gefäß von 2 ml Testvolumen mit einer Clark-Elektrode bei 25°C . Hemmstoffe und Ubichinon wurden in äthanolischer Lösung (maximal 30 μl / Messküvette) zugegeben.

6.) Tieftemperatur-Spektroskopie

Als Reduktionsmittel dienten NADH, Succinat oder Dithionit.

5 min vor Zugabe der Reduktionsmittel erfolgten die Zusätze von Inhibitoren unter sorgfältigem Mischen. Nach 1 - 10 min wurden Mess- und Referenzprobe in flüssigem Stickstoff gefroren und die Differenzspektren der Cytochrome mit einem Zweistrahl-Spektralphotometer (Cary, Model 17) bei 77°K aufgezeichnet.

7.) Raumtemperatur-Spektroskopie

Reduktionsexperimente und Spektren bei Raumtemperatur wurden mit einem Zweiwellenlängen-Spektralphotometer (Aminco-DW 2) ermittelt. Als isosbestischer Punkt diente 573 nm (46). Die spektrale Bandbreite betrug 1 nm.

Differenzspektren wurden durch punktweise Subtraktion (im Abstand von 1/2 - 1 nm) zweier Spektren errechnet. Die Zugabe und Inkubationsdauer von Substraten und Inhibitoren erfolgte analog wie im vorigen Punkt angegeben.

8.) Bindung von HQNO an oxidierte mitochondriale Partikel

Für Bindungsstudien wurde der gleiche Puffer wie für die enzymatischen Messungen verwendet, allerdings ohne Supplementation mit Cytochrom c. Die Methode von Burger et al. (10) zur Auflösung von Dissoziationskonstanten im Bereich von 10^{-9} M konnte direkt auf die HQNO-Bindungsstudien übertragen werden. Nach Abcentrifugieren der mitochondrialen Partikel wurde dem Überstand, der freies HQNO enthielt, Rinderserumalbumin zugesetzt. Durch Bindung des

Serumalbumin an HQNO wird (ähnlich wie im Fall des Antimycin) die Fluoreszenzausbeute um das ca. dreifache erhöht. Die Konzentration von BSA (0.01 mg/ml) musste jedoch 50fach erhöht werden, da die Dissoziationskonstante des Serumalbumin-HQNO-Komplexes wesentlich kleiner ist als mit Antimycin.

Die Fluoreszenz der Messproben wurde mit einem Zeiss-PMQ 3 bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm, einem Filter für das Sekundärlicht zwischen 400 und 3000 nm bei 2 mm Spaltbreite bestimmt. In dem für die Bestimmung des freien HQNO im mitochondrialen Überstand interessanten Bereich war die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität (Transmission) und der Konzentration des HQNO unter den angegebenen Bedingungen linear. Die Bindungsparameter wurden nach dem Algorithmus und mit dem Computer-Programm von Fletcher und Ashbrook (47) an dem TR 440 des Leibniz-Rechenzentrum München errechnet. Die Programmkarten wurden freundlicherweise von Prof. Ashbrook zur Verfügung gestellt. Das plot-Programm für die Computer-Aufzeichnung der Bindungskurve stellte Dr. Burger in Kooperation mit Herrn Grami zusammen.

9.) Berechnung von Hemmkurven aus Bindungsparametern

Die Berechnung theoretisch zu erwartender Hemmkurven basiert auf der graphischen Methode zur Ermittlung von Bindungsparametern von Rosenthal (48). Das Computer-Programm und das dazugehörige plot-Programm zur Aufzeichnung der Hemmkurven wurde von Dr. Burger gemeinsam mit Herrn Grami entwickelt (49).

10.) Proteinbestimmung

Vor der Proteinbestimmung (50) musste Urografin durch mehrfach wiederholte Wasch- und Zentrifugationsschritte entfernt werden (da es in dem Test eine sehr intensive Blaufärbung hervorruft und daher den Proteintest verfälscht). In Standardpräparationen von Hefestämmen, deren relativer Cytochrom b - Gehalt bekannt war, wurde der Proteingehalt auf Grundlage von Cytochrom b - Messungen (Aminco, DW 2; 563 nm - 573 nm, Dithionit - reduziert minus oxidiert) errechnet.

III. ERGEBNISSE

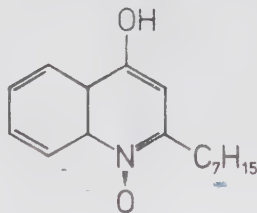
1.) Untersuchungen an Schizosaccharomyces pombe Wildtyp und ana^r - 8

Im folgenden wird die Wirkung von HQNO, Funiculosin und Dibucain auf Sch. p. Wildtyp und die Mutante ana^r - 8 dargestellt. Die Ergebnisse aus Bindungsexperimenten, enzymatischen und spektroskopischen Versuchen werden jeweils den bereits bekannten mit Antimycin erzielten Daten gegenübergestellt.

a.) Wirkung von HQNO und Antimycin

α.) Hemmung des Elektronenflusses

HQNO ist ein synthetischer Hemmstoff der Atmungskette von Eukaryonten (20, 9, 52), mit dem sich bei Sch. p. — im Gegensatz zu allen anderen verwendeten Inhibitoren — keine Wachstums-
hemmung in Glycerinmedium erzie-



HQNO

len lässt. Dies ist nur teilweise darauf zurückzuführen, dass HQNO nur schlecht in die Hefezellen diffundiert. Selbst in Gegenwart von 20 µg/ml SDS — das die Permeabilität der Zellen erhöht, ohne die Wachstumsrate zu verändern — verdoppelt sich lediglich die Generationsdauer des Wildtyps wie der Mutante ana^r - 8 bei Zusatz von 6 µM HQNO. Der schwachen Wirksamkeit dieses Hemmstoffs in vivo entspricht die Erfordernis hoher HQNO-Konzentrationen für die Hemmung des Elektronenflusses mitochondrialer Partikel: Für 50% Hemmung der NADH - Oxidase wird in beiden Stämmen ca. 50 nmol Hemmstoff/mg Mitochondrienprotein benötigt (Fig. 2, o—o; Fig. 3, o—o). Vergleichende Messungen an verschiedenen Saccharomyces - Stämmen und in Neurospora crassa ergaben ebenfalls diesen Wert.

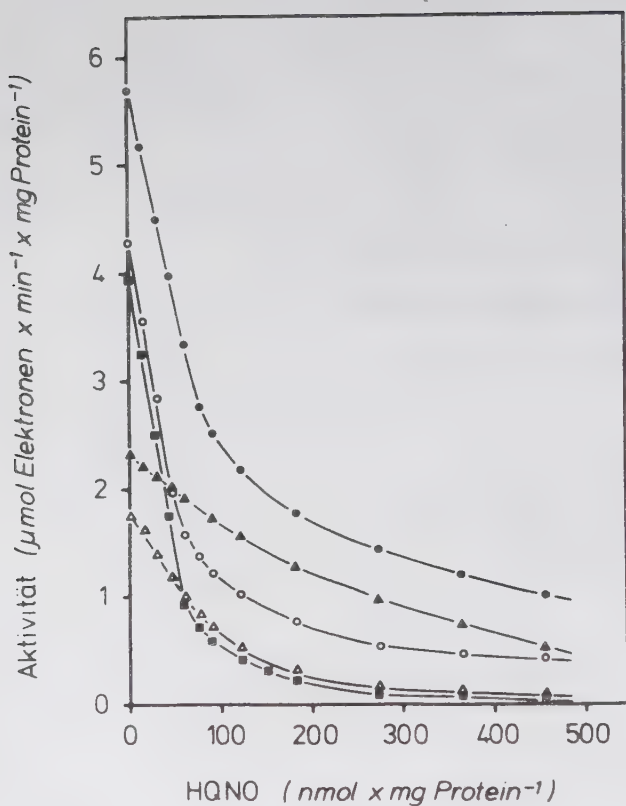


Fig. 2: Hemmung der Atmung mitochondrialer Partikel von
Sch. p. Wildtyp durch HQNO

Substrat: 1mM NADH (○ — ○); 1 mM NADH + 5 mM Succinat (■ — ■); 1 mM NADH + 26 μM Q-3 (⊙ — ⊙); 5 mM Succinat (△ — △); 5 mM Succinat + 26 μM Q-3 (▲ — ▲).
Proteinkonzentration: 25 μg/ml.

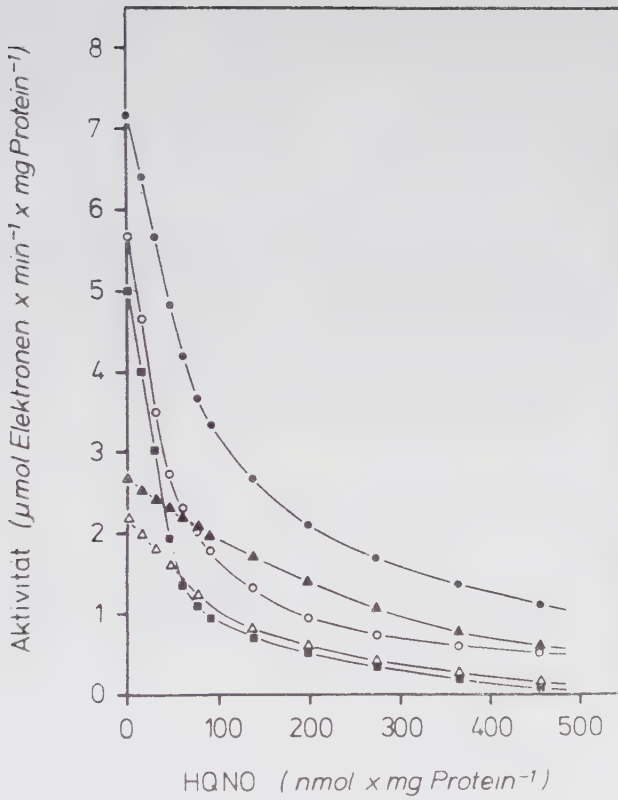


Fig. 3: Hemmung der Atmung mitochondrialer Partikel von $\text{ana}^{\text{r}} - 8$ durch HQNO

Substrate, Proteinkonzentration und Symbole wie bei Fig. 2.

Die Hemmwirkung von HQNO ist bei einem Substratgemisch aus NADH + Succinat deutlich stärker als mit den einzelnen Substraten. Die spezifische Aktivität mit dem Substratgemisch liegt bis zu ca. 15% unter der mit NADH als Substrat (vgl. Fig. 2, 3 und 4 ■—■). In beiden Stämmen von Sch. p. hebt das synthetische Q-3 (Fig. 2, 3, ●—●, ▲—▲) die Hemmwirkung des HQNO teilweise auf. Der analoge Fall der Konkurrenz eines Hemmstoffs des bc_1 - Segments mit Ubichinon wurde bereits früher bei Antimycin in der Mutante ana^r - 8 von Sch. p. beobachtet (16) (Fig. 4, ●—●, ▲—▲). Daneben wird eine bis zu 30 %ige Stimulation der NADH und Succinat - Oxidaseaktivität durch Zugabe von Q-3 verzeichnet.

Da die Aktivitätserhöhung, wie die Konkurrenz der Hemmstoffe mit Q-3 aber nicht mit dem für Sch. p. (53) und S. c. (5) natürlichen lipophilen Q-6 möglich ist, wird bei allen im folgenden beschriebenen Versuchen nur das in wässrigem Medium besser lösliche Q-3 eingesetzt.

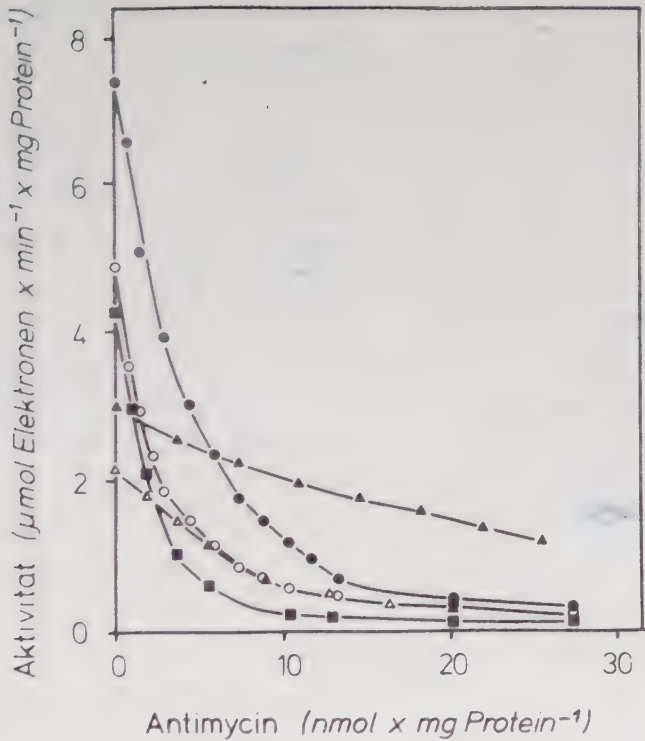


Fig. 4: Hemmung der Atmung mitochondrialer Partikel von Sch. p. ana^r - 8 durch Antimycin

Substrate, Proteinkonzentration und Symbole wie in Fig. 2 und 3

(..) Extrareduktion der b-Cytochrome mit HQNO und Antimycin

HQNO induziert wie Antimycin (16) eine zusätzliche Reduktion von b-Cytochromen in Gegenwart von NADH oder Succinat in KCN-gehemmten mitochondrialen Partikeln oder nach Erreichen des anaeroben Zustands in der Messküvette. Wenn Succinat + NADH als Substrat eingesetzt wird, ist in Mutante und Wildtyp 50% der maximum

len Extrareduktion bereits nach Zugabe von etwa 1.5 nmol HQNO/mg Protein erreicht (Fig. 5). Diese Konzentration beträgt ca. 1/30 der Konzentration, die zur 50 %igen Hemmung der Oxidaseaktivität mit denselben Elektronendonatoren notwendig ist. Ähnlich der Hemmung der Oxidaseaktivitäten ist die Abhängigkeit der zusätzlichen Reduktion der b-Cytochrome von der HQNO-Konzentration mit dem Substratgemisch aus NADH und Succinat effektiver als mit den einzelnen Substraten (5 - 20 %, für den halbmaximalen Effekt). Die durch HQNO induzierte Extrareduktion ist bei Verwendung aller Substrate oder Substratkombinationen in beiden Stämmen, dem Wildtyp und ana^R - 8, durch Zugabe von Q-3 nahezu vollständig aufhebbar (Fig. 6, 7). Dagegen ist Q-3 bei der Antimycin-induzierten Extrareduktion in beiden Stämmen wirkungslos (20).

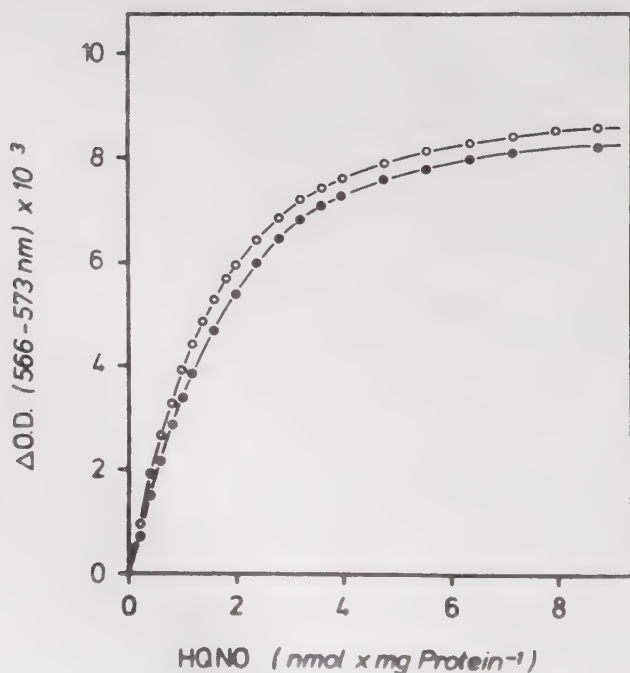


Fig. 5: s. S. 38

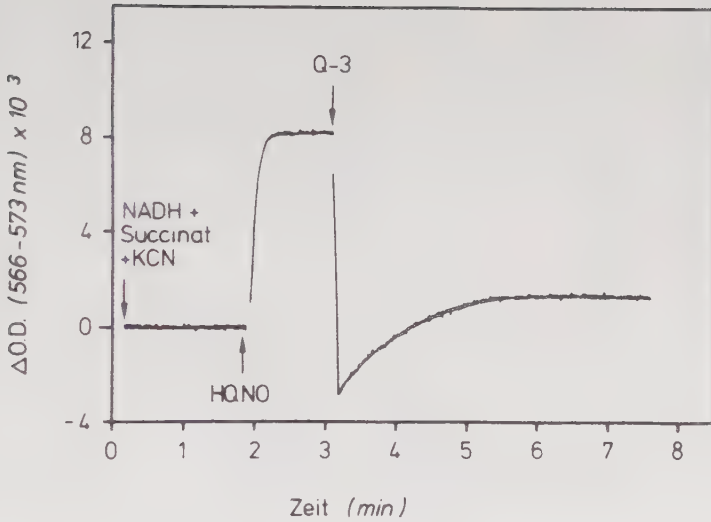


Fig. 6: Aufhebung der Extrareduktion mit Q-3 im Wildtyp von Sch. p. (Kinetik der Reaktion). Q-3: 0.2 mM; HQNO : 10 nmol/mg Protein; sonstige Bedingungen wie in Fig. 5

Fig. 5: Extrareduktion der b-Cytochrome durch HQNO im Wild-
typ von Sch. p. und in ana^R-8

Wildtyp: (○ — ○), ana^R-8 : (● — ●)

Substrat: Succinat 5mM + 1 mM NADH; KCN: 0.5 mM;
Protein: 2 mg/ml in Wildtyp und Mutante.

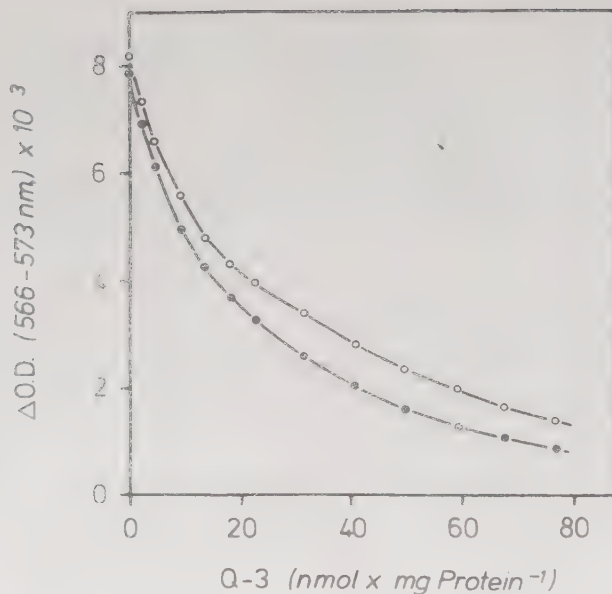


Fig. 7: Aufhebung der Extrareduktion mit Q-3 im Wildtyp und in ana^R-8 bei Sch. p. in Abhängigkeit von der Q-3-Konzentration. Wildtyp: (○ — ○); ana^R-8 : (● — ●)

HQNO: 6 nmol/mg Protein. Sonstige Bedingungen wie in Fig. 5.

Das Extrareduktionsspektrum (s. S. 13) der b-Cytochrome mit HQNO und NADH + Succinat als Substrat ist im Wildtyp und in ana^R-8 gleich. Es unterscheidet sich von den entsprechenden Spektren mit Antimycin sowohl in seiner Form als auch in der absoluten Höhe der Banden (Fig. 8). Die Differenz zwischen den Extrareduktionsspektren mit Antimycin und mit HQNO hat ein Maximum bei 564 nm. Diese für Sch. p. bisher noch nicht beschriebene Absorptionsbande wird den, nach neben Cytochrom b, (mit einer Einzelbande bei etwa 550 und 558 nm bei Raumtemperatur) bei Antimycinzugabe zusätzlich reduziert.

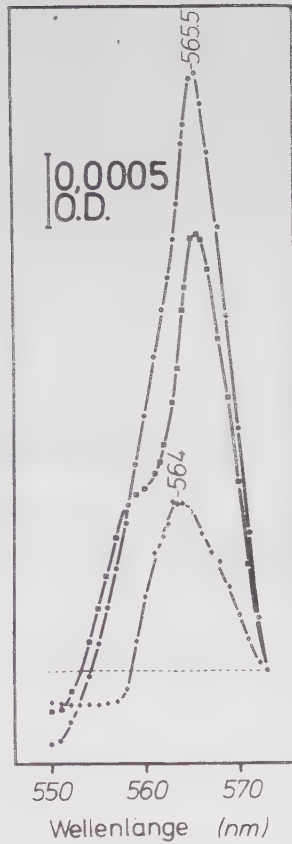


Fig. 8: Extrareduktionsspektren der b-Cytochrome mit HQNO und Antimycin beim Wildtyp (Raumtemperatur)

HQNO: 30 μ M (■—■); Antimycin: 3 μ M (●—●). Differenz zwischen Spektrum mit Antimycin und dem mit HQNO (◆—◆).

Substrat: 5 mM Succinat + 1 mM NADH; KCN: 2 mM; Protein: 1.7 mg/ml.

8.) Bindung von HQNO an mitochondriale Partikel

Die Bindung von HQNO an oxidierte mitochondriale Partikel ist erheblich affiner als es die Titrationskurven der Extrareduktion bzw. der Oxidaseaktivitäten mit HQNO erwarten liessen (vgl. Fig. 11). Wildtyp und Mutante unterscheiden sich in den Bindungsparametern nicht signifikant. Es ergeben sich in verschiedenen Experimenten unterschiedliche Werte der Dissoziationskonstanten (K_{D1}) (zwischen $1.4 - 8.2 \times 10^{-8} M$) und ihrer Konzentration ($N1$) (zwischen $100 - 170 \text{ pmol/mg Protein}$) (Tabelle II und Fig. 9).

TABELLE II

Parameter der Bindung von HQNO an oxidierte mitochondriale Partikel des Wildtyps von Sch. p. und $ana^r - 8$.

Stamm von Sch. pombe	Konzentration der spezifischen Bindungsstelle (pmol/mg Protein)	Dissoziations- konstante (M)
Wildtyp	125 - 160	$3 - 8.2 \times 10^{-8}$
$ana^r - 8$	100 - 170	$1.4 - 8 \times 10^{-8}$

Aus Tabelle II ist ersichtlich, dass die Konzentration der spezifischen Bindungsstelle für HQNO etwa der Konzentration einer der zwei spezifischen Bindungsstellen für Antimycin bei Sch. p. ($100 - 150 \text{ pmol/mg Protein}$ (10)) entspricht. Die Konzentration für 50% Ausprägung der maximal erreichbaren, durch HQNO induzierten Extrareduktion oder der 50 %igen Hemmung der entsprechen-

den Oxidaseaktivität liegt grössenordnungsmässig 10fach bzw. 300-fach über der Konzentration der spezifischen Bindungsstelle für HQNO.

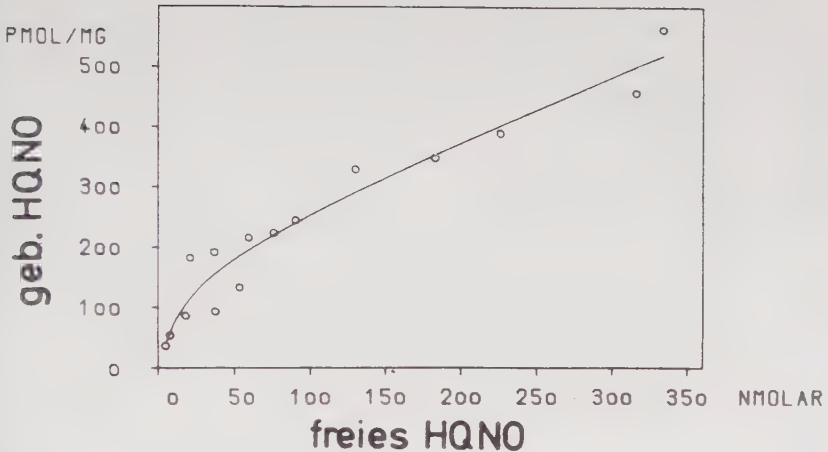


Fig. 9: Beispiel für einen Computer - plot der Bindung von HQNO an oxidierte mitochondriale Partikel von Sch. p. ana^r - 8

o: Messpunkte des Bindungstests. Protein: 1,57 mg/ml. Aus den Messpunkten wurden die Bindungsparameter mit dem Programm von Fletcher und Ashbrook errechnet (47).

—: Aus den "best fit" Parametern (eine spezifische Bindungsstelle $K_{D1} = 1.6 \times 10^{-8}$ M, $N1 = 165$ pmol/mg und eine unspezifische Bindungsstelle $K_{D2} = 0.7 \times 10^{-5}$ M, $N2 = 7.68$ nmol/mg) errechnete Kurve.

5.) Vergleich der Bindung, Extrareduktion und Hemmwirkung von HQNO

Es wird vorausgesetzt, dass jedes Molekül HQNO, das an die spezifische Bindungsstelle gebunden wird, eine Elektronentransporteinheit

inaktiviert. Es entspricht dann die Konzentration spezifischer Bindungsstellen der maximalen Aktivität und $x\%$ Hemmung $x\%$ besetzter Bindungsstellen. Mit Hilfe eines weiteren Computerprogramms lässt sich unter Berücksichtigung der gemessenen Dissoziationskonstanten für die HQNO-Bindung berechnen, mit welcher Effektivität eine Hemmung des Elektronentransports stattfinden sollte (Fig. 10).

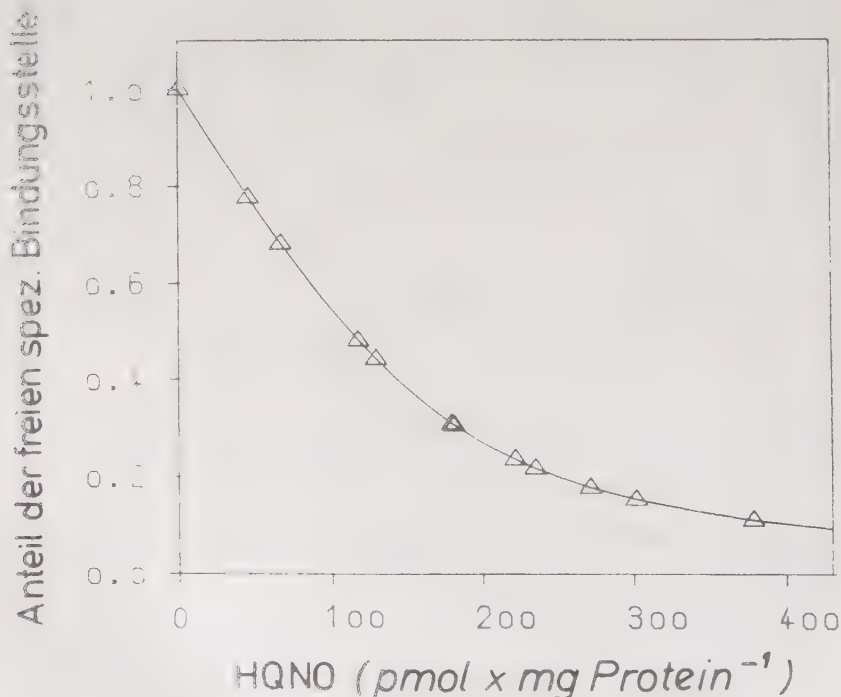


Fig. 10: Computer - plot der theoretischen Hemmkurve mit HQNO

Die in Fig. 9 errechneten Parameter sind dieser Berechnung zu Grunde gelegt (s. auch Anhang, S. 94).

Wie aus Fig. 10 zu entnehmen ist, fällt die Kurve für die Absättigung der spezifischen Bindungsstelle mit HQNO weder mit einer der gemessenen Hemmkurven (Fig. 2, 3) noch mit den Kurven für die Ausprägung der Extrareduktion durch HQNO (Fig. 5) auch nur annähernd zusammen. Ein Vergleich der Wirksamkeit von HQNO in der Bindung an die spezifische Bindungsstelle, Extrareduktion und Hemmung der Oxidaseaktivität, jeweils auf die Konzentration der spezifischen Bindungsstelle bezogen, ist in Fig. 11 für den Wildtyp zusammengefasst. Bezüglich dieser drei Tests besteht kein signifikanter Unterschied zur Mutante $\text{ana}^r - 8$, wie bereits oben ausgeführt ist.

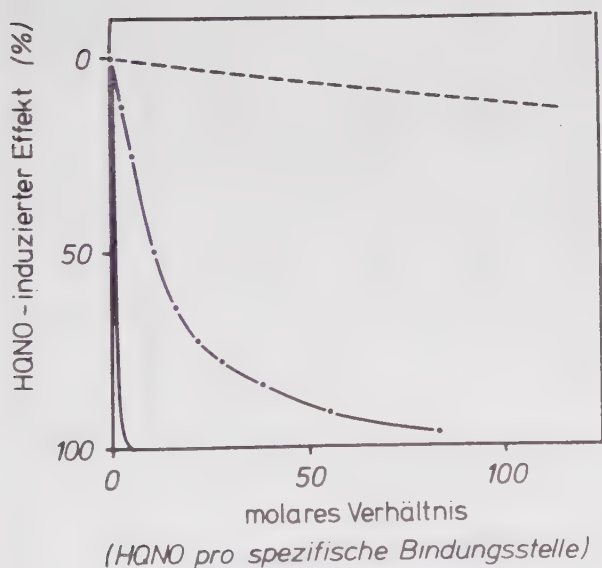


Fig. 11: Wirksamkeit von HQNO in der Bindung an die spezifische Bindungsstelle (—), Extrareduktion von Cytochrom b (●—●) und Hemmung der Oxidaseaktivität (- -).

Versuchsbedingungen wie bei Fig. 2, 5 bzw. 10.

b.) Wirkung von Funiculosin

Funiculosin ist ein Antibiotikum, das aus Penicillium funiculosum Thom. isoliert wurde. Die Summenformel ist $C_{27}H_{41}NO_7$, seine Struktur jedoch unbekannt. Es wirkt bei höheren Organismen als Hemmstoff der Atmungskette (54). Wie die Untersuchungen zeigen, blockiert es auch bei Sch. p. und S. c. in vivo und in vitro die Atmung. Die Mutante ana^r 8 ist kreuzresistent gegen Funiculosin (Fig. 12). Die Zellwand von Sch. p. ist nahezu undurchlässig für diesen Inhibitor, denn eine Hemmung der Atmung ganzer Zellen tritt nur dann ein, wenn die Zellen zuvor durch SDS permeabilisiert werden. Hierfür eignet sich eine Konzentra-

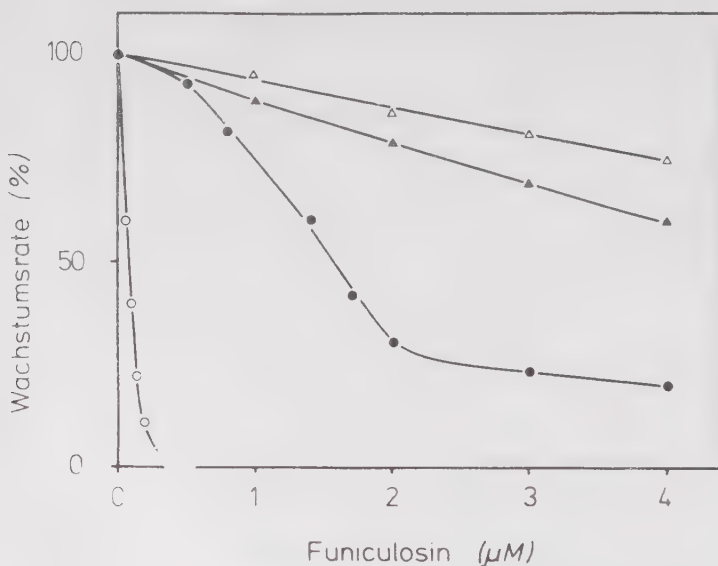


Fig. 12: Wachstumshemmung des Wildtyp von Sch. p. und ana^r 8 durch Funiculosin.

Wildtyp: offene Symbole. ana^r 8: gefüllte Symbole. SDS: $20 \mu g/ml$. Glucosemedium ($\Delta, \blacktriangle$); Glycerinmedium ($\circ, \bullet$).

tion dieses Detergens von $20 \mu\text{g/ml}$, die auf die Wachstumsgeschwindigkeit und die Zellatmung keine Einfluss hat.

Die Hemmung des Elektronenflusses mitochondrialer Partikel durch Funiculosin zeigt eine Besonderheit, die bei den anderen untersuchten Hemmstoffen nicht, bzw. bei Antimycin in weitaus geringerem Mass auftritt: Mit abnehmender Funiculosin-Konzentration verlängert sich die Dauer, bis die Hemmung ausgeprägt ist. Dies ist beispielhaft in Fig. 13 dargestellt. Die Geschwindigkeit, mit der sich die Hemmung ausprägt, ist unabhängig von der Dauer der Vorinkubation des oxidierten oder reduzierten (Anaerobiosis) Proteins mit dem Inhibitor.

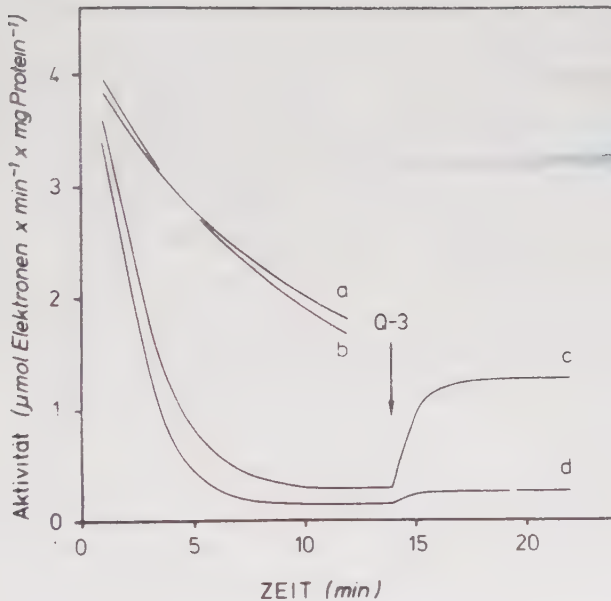


Fig. 13 : Hemmung des Elektronenflusses durch Funiculosin bei mitochondrialen Partikeln des Wildtyps von Sch.p. und von ana^r-8.

a: Wildtyp (90 nM Funiculosin); b: ana^r-8 (90 nM Funiculosin);
c: ana^r-8 (180 nM Funiculosin); d: Wildtyp (180 nM Funiculosin).

Substrat: 1 mM NADH; Protein: jeweils $25 \mu\text{g/ml}$; Q-3: 0.2 mM

Die Kurven wurden mit einem Schreiber aufgezeichnet, der die 1. Ableitung der Messung (Sauerstoffverbrauch/zeit) registriert.

Da Q-3 die Funiculosinhemmung in der Mutante ana^r -8 stärker aufhebt als im Wildtyp (Fig. 13), ist ana^r -8 nicht nur in vivo (Fig. 12), sondern auch in vitro kreuzresistent gegen Funiculosin.

Das Phänomen, dass Vorinkubation mitochondrialer Partikel mit Funiculosin zu keiner beschleunigten Ausprägung der Hemmwirkung führt, macht sich bei den Extrareduktionsexperimenten folgendermaßen geltend: Wird zu einer Substrat - reduzierten anaeroben Mitochondriensuspension Funiculosin + O_2 eingeführt, so ist die Extrareduktion zunächst gering und lässt sich erst durch längere Belüftung der Küvette maximal ausprägen.

Wird vor der Funiculosin-Zugabe 2mM KCN beigelegt, so ist im Gegensatz zu Antimycin oder HQNO nur eine sehr geringe Extrareduktion (kleiner als 30% des maximal erreichbaren Wertes) induzierbar. Für die Ausprägung der maximalen Extrareduktion durch Funiculosin ist also Elektronenfluss über eine KCN-hemmbar Komponente — offenbar die Cytochromoxidase — notwendig.

Extrareduktionsspektren in Gegenwart von Funiculosin unterscheiden sich in Mutante und Wildtyp nicht wesentlich (Fig. 14).

Auffällig ist an dem durch Funiculosin induzierten Extrareduktionsspektrum, dass mehr $\underline{b}$ -Cytochrom bei 557 nm reduziert wird, als mit Antimycin. Diese Absorptionsbande bei 557 nm (Raumtemperatur) ist wahrscheinlich identisch mit der Cytochrom $\underline{b}$ -Spezies, die bei Sch. p. durch Ubichinol-3 reduziert wird (10) und bei 77°K eine Absorptionsbande bei 553 nm besitzt.

Da Funiculosin bei Einstrahlung mit einer Hg-Lampe kein Fluoreszenzlicht emittiert, konnten mit der zur Verfügung stehenden Methodik keine Bindungsstudien durchgeführt werden.

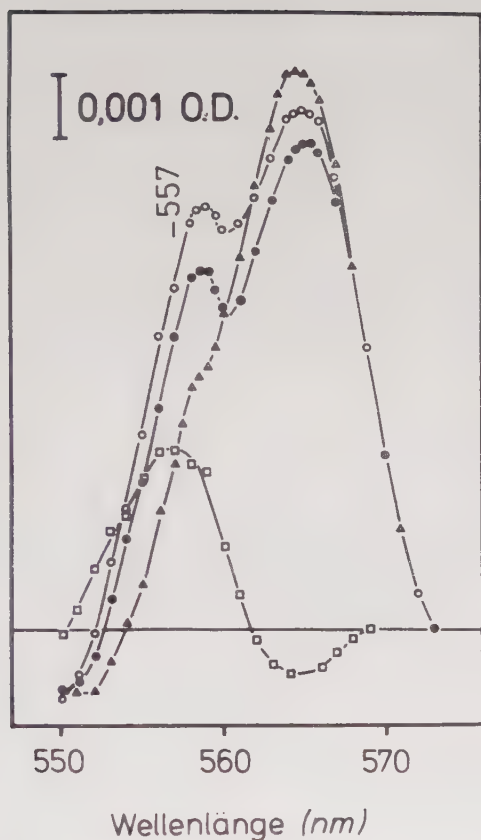
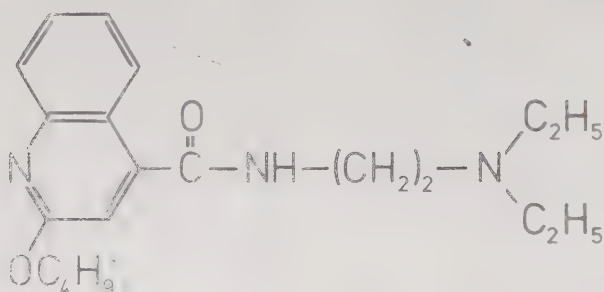


Fig. 14: Extrareduktionsspektren mit Funiculosin im Wildtyp von *Sch. p.* und in *ana^r-8* (Raumtemperatur)

Wildtyp (Funiculosin): (○—○); *ana^r-8* (Funiculosin): (●—●);
 Wildtyp (Antimycin) zum Vergleich: (△—△). Differenz zwischen
 den Extrareduktionsspektren des Wildtyps: (○—○) - (△—△) = (□—□).
 Substrat: 1 mM NADH; KCN: 0.1 mM, nach Ausprägung maximaler
 Extrareduktion Erhöhung auf 0.5 mM KCN und Aufnahme des Spektrums
 nach weiteren 10 min.
 Antimycin: 10 μM; Funiculosin: 4 μM; Protein: je 2.2 mg/ml

c.) Wirkung von Dibucain



Dibucain

Dibucain (= Nupercain) wird in der Tiermedizin als Anaesthetikum angewendet. In der Literatur wird berichtet, dass es die Valinomycin-vermittelte Diffusion von K^+ durch die Mitochondrienmembran unterbindet (66). Ausserdem findet sich ein Hinweis darauf, dass es die Phospholipase A_2 hemmt (55) und dadurch stabilisierend auf phosphorylierende Mitochondrien wirkt. An mitochondrialen Partikeln von Hefe kann diese Stabilisierung der enzymatischen Aktivitäten nicht bestätigt werden. Vielmehr erweist sich Dibucain als Hemmstoff im bc_1 -Segment der Atmungskette, wie im folgenden ausgeführt wird.

Dibucain hemmt in gleicher Weise das Wachstum ganzer Zellen im Wildtyp von Sch. p. wie in ana^r-8 (Fig. 15). Konzentrationen, die das Wachstum in YPG zum Stillstand bringen, blockieren auch nahezu vollständig die Atmungsaktivität der Zellen.

Die Hemmwirkung von Dibucain auf die Oxidase-Aktivitäten mitochondrialer Partikel könnte zunächst so gedeutet werden, dass nur die NADH-Oxidase von diesem Hemmstoff beeinflusst würde (Fig. 16).

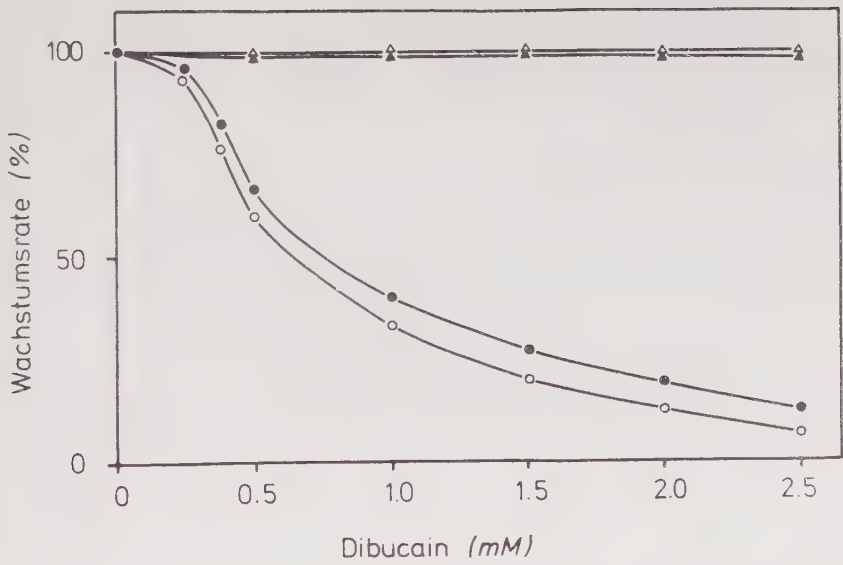


Fig. 15: Wachstumsrate vom Wildtyp von Sch. p. und von ana^r-8 in Gegenwart von Dibucain.

Wildtyp: offene Symbole. ana^r-8: gefüllte Symbole.
Glycerin (○, ●); Glucose (Δ, ▲).

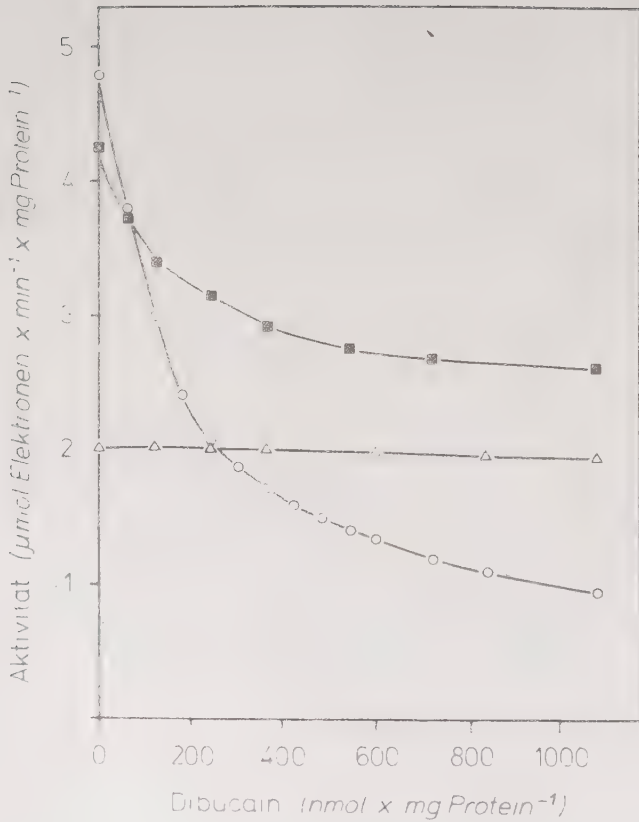


Fig. 10: Hemmung der Oxidase-Aktivitäten des Wildtyps von Sch. p. durch Dibucain

Substrat: 1 mM NADH (○—○); 5 mM Succinat (Δ—Δ).
1 mM NADH + 5 mM Succinat (■—■). Protein: 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Es zeigt sich jedoch, dass die Succinat - Oxidase - Aktivität dann durch Dibucain verringert wird, wenn höhere Konzentrationen des Hemmstoffs eingesetzt werden (Fig. 17). Entsprechend der unterschiedlich starken Hemmung der Succinat - Oxidase und NADH - Oxidase ergibt sich eine verschieden starke Aufhebung der Hemmwirkung durch Q-3 (Fig. 17). Bei Anwendung eines Gemisches aus Succinat und NADH wird die Oxidaseaktivität durch Dibucain in geringerem Ausmass gehemmt als in der NADH - Oxidase (Fig. 16). Die Hemmkurven von Wildtyp und ana^r - 8 sind in allen getesteten Parametern gleich (Fig. 17, 18).

Auf Grund der bestehenden Unterschiede in der Sensitivität der Messmethoden ist es notwendig, bei Messung der Extrareduktion von Cytochrom b die ca. 100fache Proteinkonzentration wie bei der Atmungsmessung mitochondrialer Partikel einzusetzen. Unterstellt man in beiden Tests eine gleiche Wirksamkeit von Dibucain, so läge die bei der Extrareduktion anzuwendende Konzentration des Hemmstoffs im Falle von NADH als Substrat wenig unter und im Falle von Succinat jenseits der Löslichkeitsgrenze. Unerwarteterweise ist aber eine Extrareduktion nur in Gegenwart von Succinat zu erzielen (Fig. 19) und nicht mit NADH. Die Abhängigkeit der zusätzlichen b-Cytochrom-Reduktion von der Dibucainkonzentration ist für Succinat und das Gemisch aus Succinat und NADH gleich (ohne Abb.).

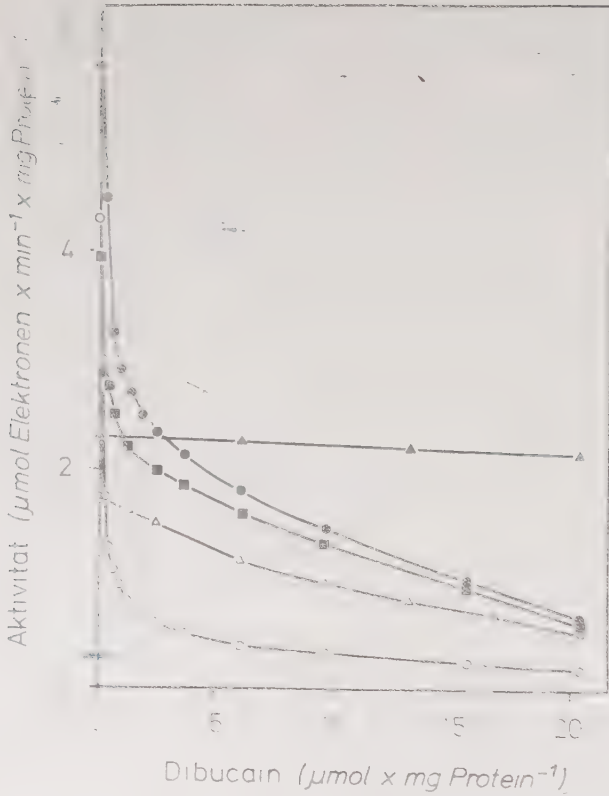


Fig. 17: Hemmung der Oxidase-Aktivitäten durch höhere Konzentrationen Dibucain und Aufhebung der Hemmung mit Q-3 bei n. Wildtyp von Sch. p.

Succinat (Δ — Δ); NADH + Succinat (■ — ■); NADH + Q-3 (● — ●); Succinat + Q-3 (▲ — ▲).

(Wirkung niedrigerer Dibucainkonzentrationen (bis 1 μmol/mg Protein) s. Fig. 16)

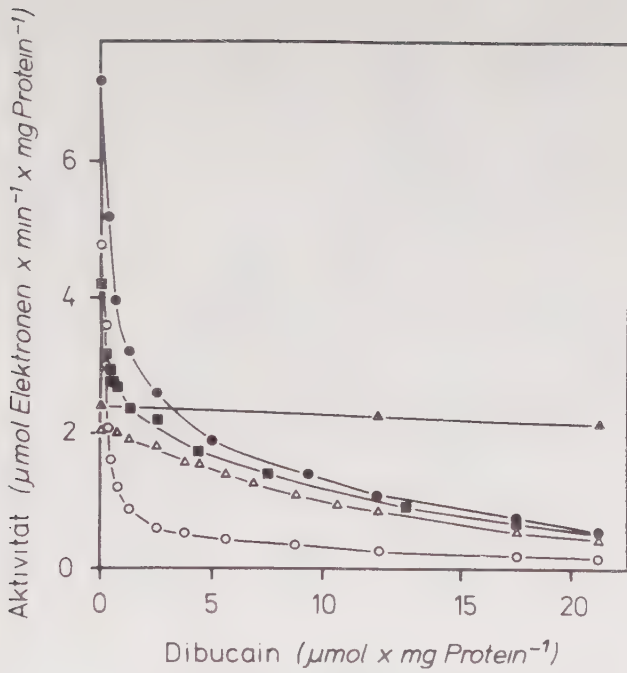


Fig. 18: Hemmung der Oxidase-Aktivitäten durch höhere Konzentrationen Dibucain und Aufhebung der Hemmung mit Q-3 bei ana^r - 8

Bedingungen und Symbole wie bei Fig. 17 .

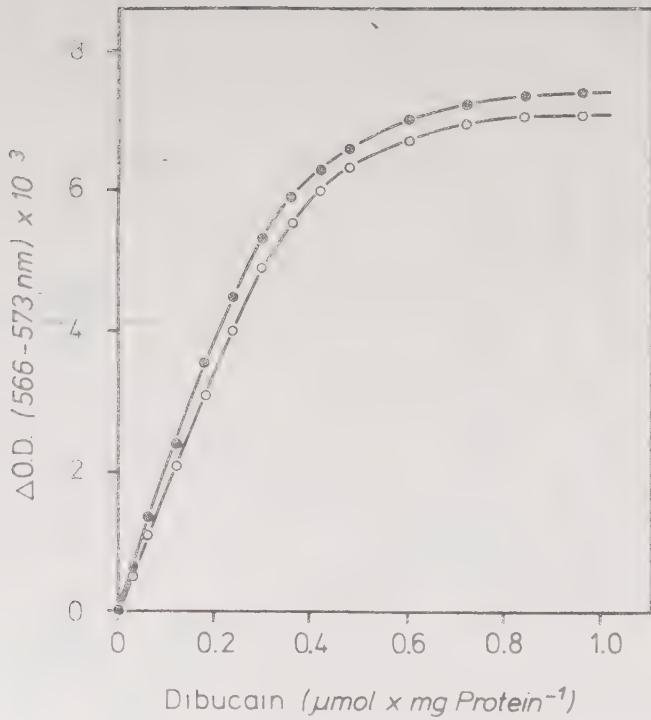


Fig. 19: Extrareduktion mit Dibucain nach Reduktion mit Succinat
im Wildtyp von Sch. p. und in $\text{ana}^i - 8$.

Wildtyp: (○ — ○); $\text{ana}^i - 8$: (● — ●).

Succinat: 5 mM. KCN: 2 mM. Protein: 2 mg/ml.

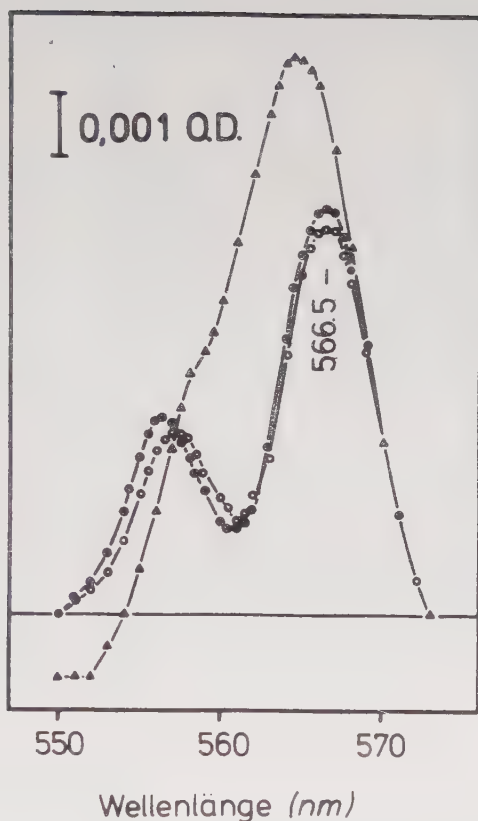


Fig. 20: Extrareduktionsspektren mit Dibucain nach Reduktion mit Succinat im Wildtyp von Sch. p. und in ana^r-8 .
(bei Raumtemperatur).

Wildtyp (○—○), Protein: je 6.6 mg/3 ml. ana^r-8 (●—●), Succinat: 5mM. KCN: 2 mM. Dibucain: 3mM.

Zum Vergleich ist ein Extrareduktionsspektrum des Wildtyps mit Antimycin (20 μM) eingezeichnet. (NADH: 1mM, KCN: 2mM) (Δ — Δ).

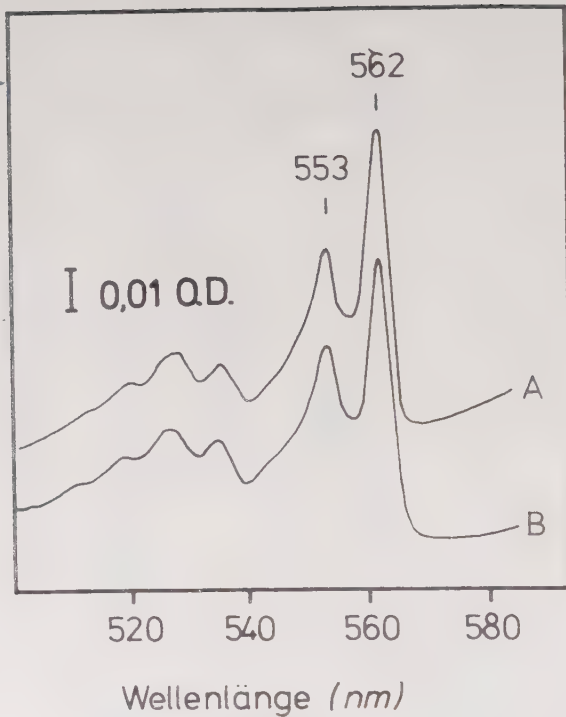


Fig. 21: Extrareduktionsspektren mit Dibucain nach Reduktion mit Succinat des Wildtyps von *Sch. p.* und von ana^r-8 (bei 77°K).

A: Wildtyp. B: ana^r-8 . Protein: je 10 mg/ml. Dibucain: 9mM. KCN: 2 mM. Succinat: 5 mM.

(Siehe zum Vergleich die Extrareduktionsspektren mit Antimycin in Veröffentlichung (16). Die Absorptionsbanden liegen unter diesen Bedingungen bei 555 nm und 561 nm .)

Aus welchen Absorptionsmaxima sich die Extrareduktion der b-Cytochrome zusammensetzt, ist aus den entsprechenden Extrareduktionsspektren ersichtlich (Fig. 20, 21). In Abb. 20 ist zum Vergleich das mit Antimycin induzierbare Extrareduktionsspektrum des Wildtyps eingezeichnet. Aus den Spektren (Fig. 20, 21) ist ablesbar, dass durch Dibucain (ähnlich Funiculosin) bei 557 nm (Raumtemperatur) mehr b-Cytochrom zusätzlich reduzierbar ist als durch Antimycin (vgl. Fig. 14). Im Unterschied zu dem Extrareduktionsspektrum mit Antimycin ist bei dem mit Dibucain die Höhe der Banden geringer und das Maximum von 565 nm nach 566.5 - 567.5 nm (Raumtemperatur) verschoben. Noch deutlicher ist die Differenzierung bei den Tieftemperspektren (77°K).

Es zeigt sich, dass 557 nm (Raumtemperatur) der Bande bei 553 nm (77°K) und 567 nm (Raumtemperatur) der Bande bei 562 nm (Tieftemperatur) entspricht (Fig. 20, 21). Eine reine Absorptionsbande bei 562 nm (77°K) wurde bisher für Sch. p. nicht beobachtet und ist vermutlich das Cytochrom b₅₆₆ dieses Organismus.

Die durch Dibucain induzierte Extrareduktion ist mit 0.2 mM Q-3 im Wildtyp und in ana^r-8 zu 40 - 50 % aufhebbar.

d.) Doppelsubstratspektren

Da Succinat die NADH - Oxidase im Wildtyp von Sch. p. und in ana^r-8 bis zu 10 % hemmt und ausserdem die Hemmwirkung von HQNO und Antimycin verstärkt wird nun versucht diese Effekte mit einer Veränderung des Reduktionsgrades der b-Cytochrome bei Anwesenheit des Substrats gemischtes zu korrelieren. Hierfür werden die b-Cytochrome des anaeroben Zustands durch Reduktion mitochondrialer Partikel mit Succinat oder NADH beobachtet werden.

noch stärker. Zum Grössenvergleich ist in Fig. 22 das Extrareduktionsspektrum mit Antimycin beim Wildtyp (vgl. Fig. 8) eingezeichnet.

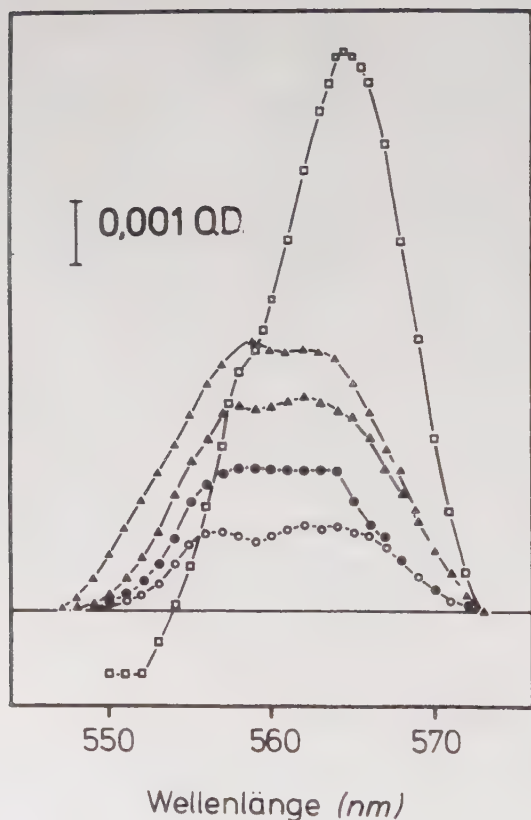


Fig. 22: Zusätzliche Reduktion der b-Cytochrome mit Succinat nach NADH-Reduktion im Wildtyp von Sch. p. und in ana^r-8

Offene Symbole: Wildtyp; gefüllte Symbole: ana^r-8

(○, ●): (Succinat, KCN) minus (NADH, KCN)

(△, ▲): (NADH, Succinat, KCN) minus (NADH, KCN)

Zum Grössenvergleich ist das Extrareduktionsspektrum mit Antimycin (20 μ M) beim Wildtyp eingezeichnet (Substrat: 1 mM NADH): (□-□)

Substrate: NADH (1 mM), Succinat (5 mM); KCN: 2 mM; Protein: 2.2 mg

e.) Cytochrom b - Reduktion ohne Einsatz von externen Substraten

Die Verwendung einer Reihe von Hemmstoffen im bc₁-Segment führte zur Differenzierung von mindestens 2 b-Cytochrom-Spezies. Eine zweite Methode zur Unterscheidung weiterer b-Cytochrome ist, das Redox-Potential des Elektronen-Donors zu verändern.

Da es in den vorher beschriebenen Versuchen durch die Gabe von 1 mM NADH bzw. 5 mM Succinat relativ hoch lag, werden nun Bedingungen gewählt, unter denen das Redox-Potential wesentlich verringert ist. Dazu werden mitochondriale Partikel durch mehrfaches Waschen mit hypotonischem Puffer (1 mM EDTA, 25 mM Tris pH 6.5) von niedermolekularen Substanzen wie Substraten weitgehend befreit. Die so behandelten mitochondrialen Membranen zeigen ohne Zugabe von NADH oder Succinat einen geringen Elektronentransport, der ausreicht, um in Gegenwart bestimmter Hemmstoffe (Antimycin oder HQNO, nicht aber Fusiculosin oder Dibucain) eine Cytochrom b-Reduktion zu bewirken.

Die Absorptionsmaxima in Gegenwart von Antimycin in Sch. p. Wildtyp und $\text{ana}^{\text{r}}-8$ sind von etwa gleicher relativer Höhe und liegen bei Raumtemperatur zwischen 562 und 563 nm (Fig. 23).

Dass in den aufgenommenen Raumtemperaturspektren mehrere Absorptionsbanden enthalten sind, ist aus entsprechenden Tieftemperaturspektren zu entnehmen. Die beiden Absorptionsbanden liegen für beide Hemmstoffe und Wildtyp wie $\text{ana}^{\text{r}}-8$ bei 559 nm und 555 nm und sind in allen Fällen von fast gleicher Höhe (Fig. 24; nur für den Wildtyp eingezeichnet).

Alle im vorigen dargestellten Messungen wurden ausserdem mit einer weiteren Antimycin - resistenten Mutante von Sch. p., $\text{ana}^{\text{r}}-14$, durchgeführt. Sie unterscheidet sich in keinem Test von $\text{ana}^{\text{r}}-8$. Dennoch handelt es sich nicht um identische Mutanten, da in Kreuzungen zwischen $\text{ana}^{\text{r}}-8$ und $\text{ana}^{\text{r}}-14$ ca. 1 % Rekombinanten auftreten (56).

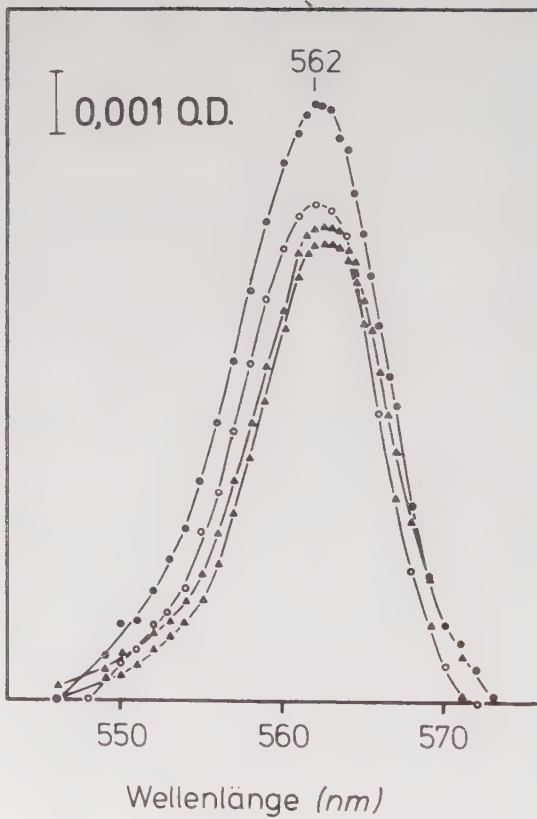


Fig. 23: Cytochrom b - Spektren ohne Zusatz von Substrat in Gegenwart von HQNO bzw. Antimycin im Wildtyp von Sch. p. und in ana^r-8 (bei Raumtemperatur)

Wildtyp: gefüllte Symbole. ana^r-8: offene Symbole. HQNO: 0.1 mM (○, ●). Antimycin: 0.02 mM (Δ, ▲). Protein: 4 mg/ml.

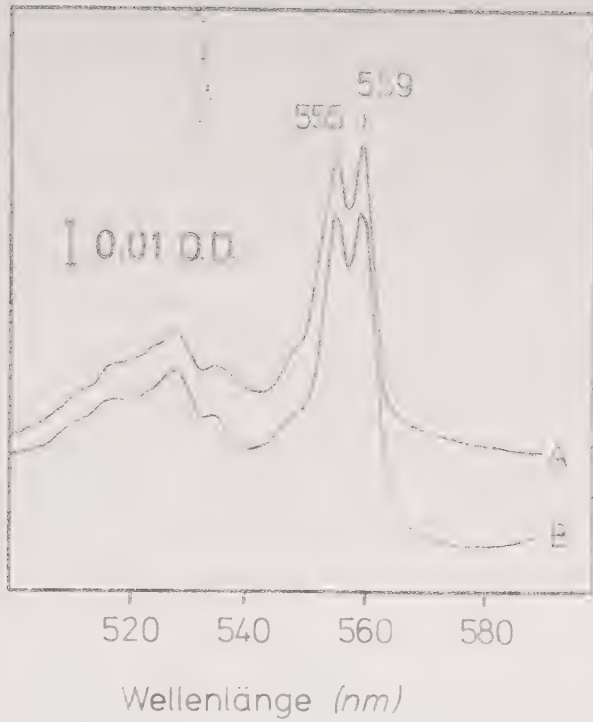


Fig. 24 : Cytochrom b - Spektren ohne Zusatz von Substrat in Gegenwart von HQNO bzw. Antimycin im Wildtyp von *Sch. p.* (77°K)

A: 0.1 mM HQNO. B: 0.02 mM Antimycin. Protein: 10 mg/ml.

2.) Vergleich des Wildtyps von S. c. und Sch. p.

Der Wildtyp von S. c. wurde denselben Messungen unterzogen, wie der Wildtyp von Sch. p. Die Wirksamkeit der verwendeten Hemmstoffe stimmt bei beiden Stämmen weitgehend überein. Unterschiede gelten im wesentlichen für Antimycin und Funiculosin.

a.) Wirkung von Antimycin

Der Wildtyp von S. c. ist im Wachstum deutlich empfindlicher gegen Antimycin als der von Sch. p. So ist in den meisten Wildtypstämmen bei S. c. auf Glycerinplatten mit 5 ng/ml Antimycin keine Koloniebildung innerhalb von 10 Tagen festzustellen, während die Wachstumsgrenze für Sch. p. Wildtyp bei 30 ng Antimycin/ml liegt. Die quantitative Abhängigkeit der Wachstumsrate von der Antimycinkonzentration bei S. c. zeigt Fig. 25.

Weiterhin ist es für S. c. charakteristisch, dass die Hemmkurven der NADH-Oxidase mit Antimycin annähernd linear, die Extrareduktionskurven dagegen deutlich sigmoidal verlaufen (s.u.), während bei Sch. p. beide Kurven sigmoidal sind (10, 46).

b.) Wirkung von Funiculosin

Ohne SDS-Zusatz ist das Wachstum von S. c. sensitiver gegen Funiculosin als von Sch. p. In Gegenwart des Detergens verkehren sich jedoch diese Verhältnisse (vgl. Fig. 14 und 29), denn die Wirksamkeit der Wachstumshemmung durch Funiculosin wird in Sch. p. in weit grösserem Masse durch SDS verstärkt als in S. c.. Unterschiede ergeben sich auch in der Kinetik der Funiculosinhemmung von mitochondrialen Partikeln. Eine 50%ige Hemmung der NADH-Oxidase ist bei S. c. nach ca. 30 - 40 min maximal ausgeprägt, während bei Sch. p. selbst nach 60 min noch kein Gleichgewicht erreicht ist (vgl. Abb. 13). Es ist daher nur bei S. c. möglich, mit diesem Inhibitor Hemmkurven aufzunehmen (Fig. 31).

3.) Vergleich des Wildtyps mit einigen Mutanten von *S. c.*, die gegen Hemmstoffe des bc₁-Segments resistent sind

Eine der Mutanten von *S. c.*, die nach NG-Behandlung auf dem ein- bzw. Fungus- und Naltigen Platten hochwachsen, wurde angezüchtet und gemeinsam mit einer dritten, Antimycin-resistenten Mutante *ana*^r-101 chemisch charakterisiert.

a.) Charakterisierung der Mutante *ana*^r-101

Bezogen auf 50 % Wachstumshemmung des Wildtyps durch Antimycin in Glycerinmedium ist der Resistenzgrad der Mutante *ana*^r-101 etwa 11fach (Fig. 25).

Dagegen differieren die Antimycinkonzentrationen für 50 %ige Hemmung der NADH - Oxidase nicht signifikant bei Wildtyp und Mutante. Verschieden ist lediglich die Form der Hemmkurven: Sie ist schwach sigmoidal beim Wildtyp und linear bei der Mutante (Fig. 26A, 27A)⁴⁾. Die ungleiche Stärke der Antimycin - Bindung an die mitochondrialen Partikel von Mutante und Wildtyp und damit die in vitro Resistenz von *ana*^r-101 gegen Antimycin ist durch folgende Experimente nachweisbar:

- BSA, welches Antimycin mit einer Dissoziationskonstante von $0.12 \mu\text{M}$ bindet (15), stellt die durch Antimycin gehemmte Aktivität der NADH - Oxidase bei *ana*^r-101 wieder her, jedoch nicht bzw. nicht messbar beim Wildtyp (Fig. 26B, 27B).
- Q-3 (welches bei *ana*^r-8 (Sch. p.) die Wirkung von Antimycin abschwächt (16)), vergrößert unter den gegebenen experimentellen Bedingungen in *ana*^r-101, nicht aber im Wildtyp von *S. c.*

⁴⁾ Werden die mitochondrialen Partikel lediglich durch differentielle Zentrifugation gewonnen (keine Nachreinigung durch Urografingradienten), so entfällt dieser Unterschied: Im Wildtyp wie in *ana*^r-101 sind die Kurven dann linear.

die Antimycin - Konzentration für 50 %ige Hemmung auf das ca. 2-fache (Fig. 26A, 27A). Eine Steigerung der NADH - Oxidase - Aktivität durch Q-3 wird bei allen hier untersuchten Saccharomyces- wie Schizosaccharomyces-Stämmen beobachtet.

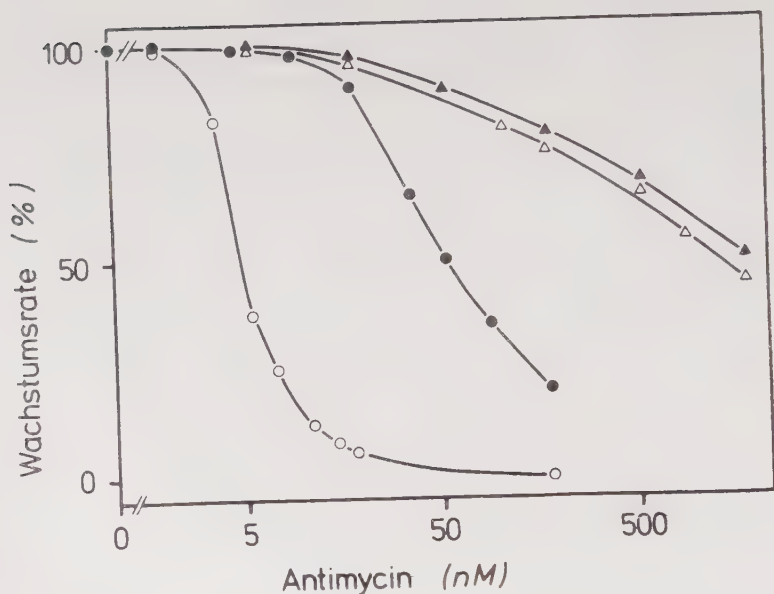


Fig. 25: Hemmung des exponentiellen Wachstums durch Antimycin beim Wildtyp von S. c. und bei ana^R-101

Wildtyp: offene Symbole. ana^R-101: gefüllte Symbole.
Glycerinmedium: (○, ●); Dextrosemedium: (△, ▲). Es wurden isonucleäre, diploide Stämme (aus der Kreuzung Nr. 3, Tabelle IV, S. 65) verwendet.

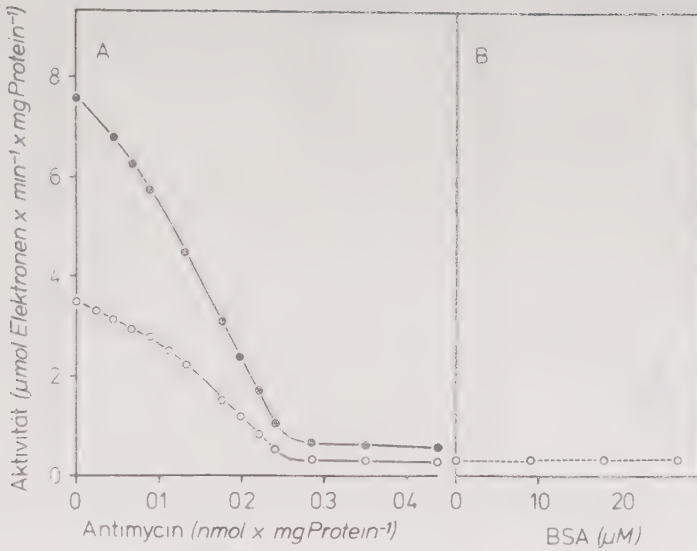


Fig. 26: Hemmung der NADH - Oxidase durch Antimycin beim Wildtyp von *S. c.* und Wirkung von Q-3 und BSA auf die Hemmung

A: Titration der NADH - Oxidase mit Antimycin (O — O); in Gegenwart von Q-3 (● — ●).

B: Titration der Antimycin-gehemmten NADH - Oxidase mit BSA. (0.28 nmol Antimycin/mg Protein).

Substrat: 1mM NADH; Q-3: 0.1mM; Protein: 42 $\mu\text{g/ml}$.

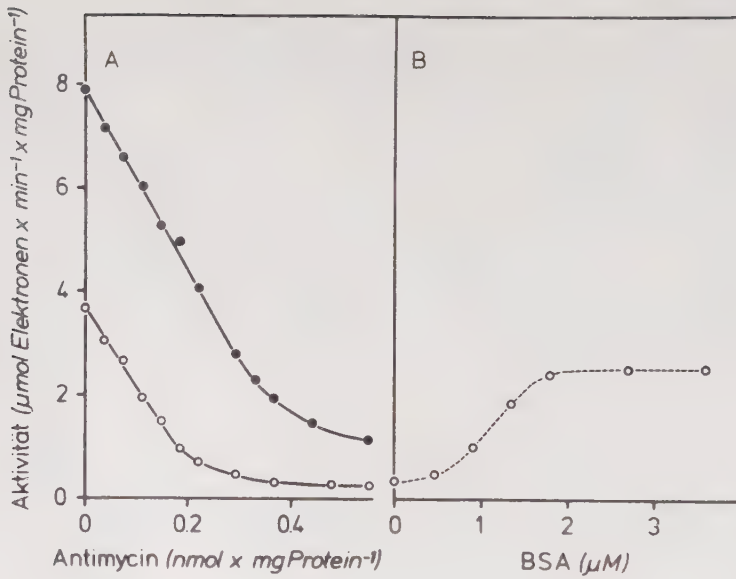


Fig. 27: Hemmung der NADH - Oxidase durch Antimycin bei $\text{ana}^{\text{r}} - 101$
und Wirkung von Q-3 und BSA auf die Hemmung

Symbole wie in Fig. 26A, B

B: Antimycinkonzentration $0.33 \text{ nmol/mg Protein}$

Substrat: 1 mM NADH ; Q-3: 0.1 mM ; Protein: $38 \mu\text{g/ml}$.

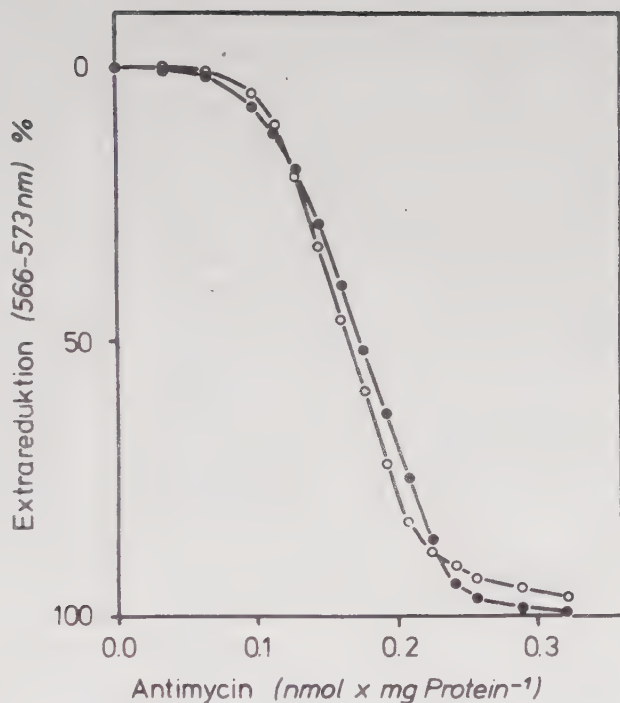


Fig. 28: Extrareduktion der b-Cytochrome mit Antimycin beim Wildtyp von S. c. und der Mutante ana^r-101

Wildtyp (● — ●), Mutante ana^r-101 (○ — ○).

Protein: 2.2 mg/ml; Substrat: 1 mM NADH; KCN: 0.5 mM

Für die zusätzliche Reduktion der b-Cytochrome wie die Hemmung der NADH - Oxidase durch Antimycin sind im Wildtyp und in ana^r-101 etwa gleiche Antimycinkonzentrationen notwendig (Fig. 28). 90 % der maximal erreichbaren Extrareduktion wird durch Antimycinkonzentrationen erreicht, die ebenfalls zu etwa 90 % Hemmung der NADH- Oxidase im Wildtyp (Fig. 26) wie in ana^r-101 (Fig. 27) führen.

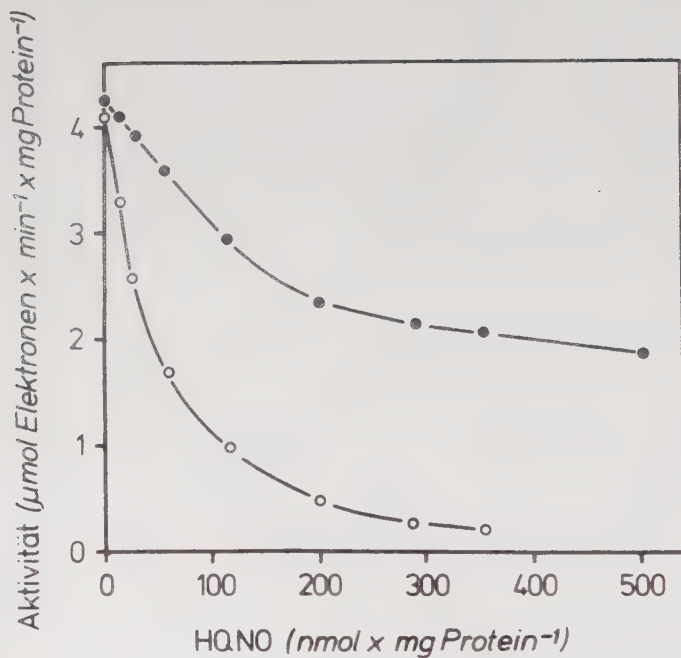


Fig. 29: Hemmung der NADH - Oxidase mit HQNO beim Wildtyp von *S. c.* und bei ana^R-101

Wildtyp: (○ — ○); ana^R-101: (● — ●).
 Protein: 40 μg/ml; NADH: 1 mM.

Ein deutlicher Nachweis für eine Veränderung der Atmungskette der Mutante zeigt sich in der Hemmung der NADH - Oxidase durch HQNO. Die NADH - Oxidase-Aktivität ist in der Mutante ana^r - 101 teilresistent gegen HQNO, verglichen mit dem Wildtyp von S. c. (Fig. 28). Das gemeinsame Auftreten der Resistenz gegen HQNO und Antimycin wird nur bei ana^r - 101, nicht aber bei den bisher bekannten Antimycin-resistenten Mutanten von Sch. p. beobachtet. Dass die Resistenz der NADH - Oxidase mitochondrialer Partikel aus ana^r - 101 gegen HQNO im Gegensatz zu Antimycin auch ohne Zusatz von Q-3 nachweisbar ist, erklärt sich aus der geringeren Bindungsaffinität des HQNO. In der Empfindlichkeit gegen Dibucain und Funiculosin gleichen sich ana^r - 101 und der Wildtyp sowohl in vivo als in vitro. Die Funiculosin-hemmkurven von ana^r - 101 sind im folgenden Punkt; der die Charakterisierung einer Funiculosin-resistenten Mutante behandelt, enthalten (Fig. 30, 31).

b.) Charakterisierung der Mutante fun^r - 202 (S. c.)

Die 50 %ige Wachstumshemmung in Glycerinmedium ist für die Mutante fun^r - 202 auf Grund unzureichender Löslichkeit von Funiculosin im Medium experimentell nicht ermittelbar. Schätzungsweise würde für die 50 %ige Hemmung mehr als die 10-fache Funiculosin-Konzentration, verglichen mit dem Wildtyp, benötigt (Fig. 30). Das Wachstum der Mutante ist zugleich resistent gegen Antimycin. Die Antimycinhemmkurven der NADH - Oxidase mit oder ohne Q-3-Zusatz sind jedoch in mitochondrialen Partikeln des Wildtyps und der Mutante fun^r - 202 gleich (vgl. Fig. 31), ebenso die HQNO-Hemmkurven (vgl. Fig. 29). fun^r - 202 ist also in vitro nicht kreuzresistent gegen Antimycin und HQNO. Auch ist die Sensitivität bezüglich Dibucain gegenüber dem Wildtyp unverändert.

c.) Charakterisierung der Mutante $\text{mik}^r - 1$

Diese Mutante wurde in einem anderen Laboratorium als Resistenzmutante gegen Mikamycin, einen Hemmstoff der Proteinsynthese, isoliert (41). Von der gleichen Arbeitsgruppe wurde jedoch kürzlich be-

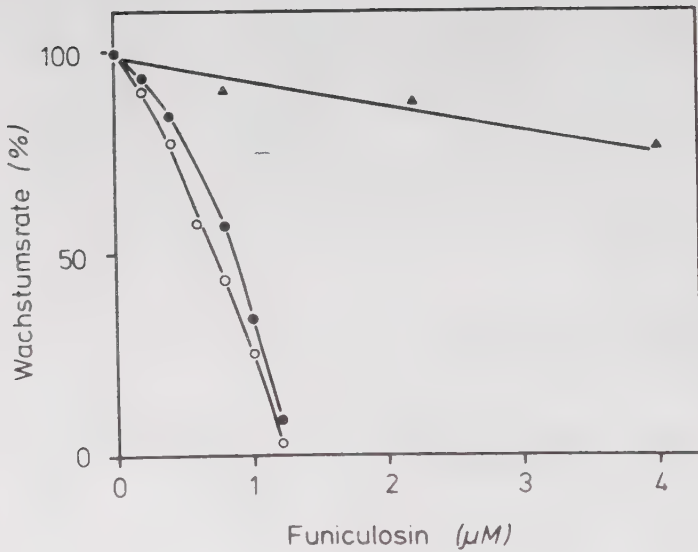


Fig. 30: Hemmung des exponentiellen Wachstums durch Funiculosin des Wildtyps von S.c., bei $\text{fun}^r - 202$ und $\text{ana}^r - 101$.

Wildtyp ($\circ - \circ$); $\text{ana}^r - 101$ ($\bullet - \bullet$); $\text{fun}^r - 202$ ($\blacktriangle - \blacktriangle$) jeweils in Glycerinmedium. Auf Glucosemedium ist mit $4 \mu\text{M}$ Funiculosin weniger als 10 % Hemmung feststellbar (nicht eingezeichnet).

richtet, dass Mikamycin unrein gewesen sei und als hauptsächlich wirksame Komponente Antimycin enthalte (57). Meine Versuche bestätigen eine Antimycin-Resistenz in vivo. In vitro ist jedoch kein Unterschied zum Wildtyp feststellbar, auch nicht nach Zusatz von Q-3 oder BSA. Vielmehr erweist sich, dass mik^r-1 in vivo und in vitro gegen Funiculosin resistent ist und bezüglich aller gemessener Eigenschaften der Mutante fun^r-202 ähnelt (Fig. 31 und Tabelle V, S. 66).

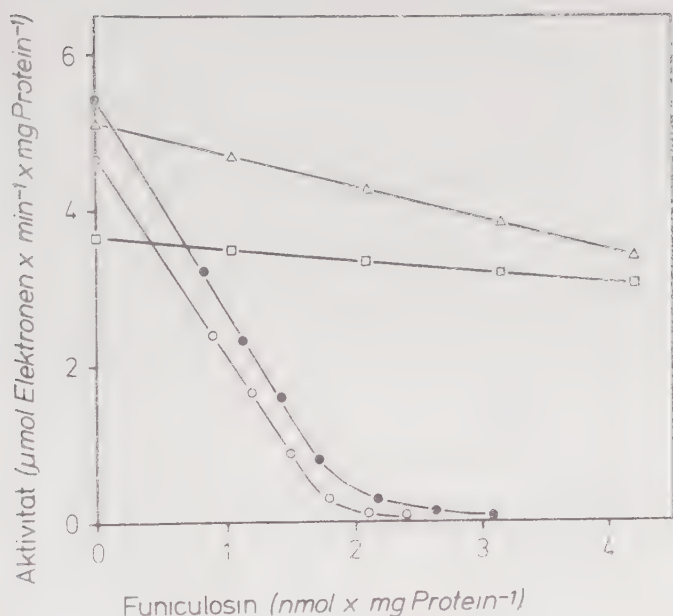


Fig. 31: Hemmung der NADH - Oxidase durch Funiculosin beim Wildtyp von *S. c.*, bei ana^r-101 , fun^r-202 und mik^r-1 .
 Wildtyp: (○ — ○). ana^r-101 : (● — ●). fun^r-202 : (△ — △).
 mik^r-1 : (□ — □). Protein: je 30 μg/ml; NADH: 1

Tabelle III. Resistenz der Mutanten ana^r - 101, fun^r - 202 und mik^r - 1 gegen Hemmstoffe des bc₁-Segments.

Stamm	Wachstum auf Glycerinmedium +		Hemmung der NADH - Oxidase durch			HQNO	Extra- reduktion Anti- mycin
	Anti- mycin	Funi- culosin	Anti- mycin	Anti- mycin + Q-3	Funi- culosin		
wt	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
ana ^r - 101	10.5	1.0	1.0	1.5	1.0	2.0	1.0
fun ^r - 202	ca. 10.0	ca. 11.0	1.0	1.0	ca. 6.0	1.0	-
mik ^r - 1	8.5	9.0	1.0	1.0	ca. 12.0	1.0	-

Die Konzentrationen der Hemmstoffe bei 50 %igem Wirkungsgrad wurden zu dem entsprechenden Wert beim Wildtyp (wt) in Relation gesetzt.
Die Zahlen wurden auf .5 ab- bzw. aufgerundet.

Tabelle III gibt abschliessend eine Übersicht über die Resistenzgrade der Mutanten von S.c. gegen die unterschiedlichen Hemmstoffe und unter den verschiedenen Versuchsbedingungen.

4.) Genetische Untersuchungen der Resistenzmutanten von S.c.

Die biochemischen Untersuchungen zeigten, dass die Mutanten $\text{ana}^r - 101$, $\text{fun}^r - 202$ und $\text{mik}^r - 1$ funktionale Veränderungen im bc_1 -Segment der Atmungskette aufweisen. Da $\text{mik}^r - 1$ nachgewiesenermassen eine mitochondriale Mutation ist (41), steht nun auch für die beiden im Rahmen dieser Arbeit isolierten Mutanten die Frage nach der Lokalisation dieser Mutationen zur Beantwortung an.

a.) Nachweis der mitochondrialen Vererbung der Mutation $\text{ana}^r - 101$

Ein wichtiges Kriterium für die mitochondriale Vererbung einer Mutation ist die Kovarianz der Transmission eines Markers mit anderen mitochondrialen Markern. (D.h. höhere (niedrigere) Übertragungswahrscheinlichkeit (Transmission) eines mitochondrialen Markers auf die Nachkommenschaft einer Kreuzung relativ zu einer anderen hat ebenfalls eine höhere (niedrigere) Transmission der restlichen mitochondrialen Marker zur Folge.) Kovarianz der Transmission des Antimycinresistenzmarkers mit den hier verwendeten Markern der Resistenz gegen Chloramphenicol ($\text{cap}^r - 321$), Erythromycin ($\text{ery}^r - 221$), Oligomycin ($\text{oli}^r - 1$) und Paromomycin ($\text{par}^r - 454$) ist nachweisbar (s. entsprechend 58, 42, 43).

Die Transmissionswerte aus 4 verschiedenen Kreuzungen, die die Mutation $\text{ana}^r - 101$ einbeziehen, sind in Tabelle IV zusammengestellt.

Tabelle IV. Transmission der Mutation ana^{r} - 101 und anderer mitochondrialer Marker

Kreuzung Nr.	Transmission (%)					Kolonien
	CAP	ERY	OLI1	PAR	ANA	
1.) SM 11-6C x IL 993-5C	35.5	35.2	32.3	33.6	41.0	369
2.) SM 11-6C x BM1421-9C	—	—	54.2	54.2	54.4	535
3.) SM 11-6C x SM 821-7C	—	58.3	60.1	—	52.9	582
4.) SM 11-6C x KL 58-2A	—	68.2	—	74.6	67.6	485

Um Kopplungsbeziehungen zwischen den verwendeten Markern zu finden, werden aus den Kreuzungen die Rekombinationshäufigkeiten errechnet. Das Maximum der Rekombinationshäufigkeit in Kreuzungen zwischen mitochondrialen Markern ist etwa 25 % (59). Bei Erreichen dieses Sättigungswertes sind keine Aussagen über Kopplungsbeziehungen mehr möglich. Die in Tabelle V aufgeführten Werte zeigen in Übereinstimmung mit den Literaturwerten deutliche Kopplung nur zwischen ery^{r} - 221 und cap^{r} - 321, sowie oli^{r} - 1 und cob^{ts} - 1284, nicht jedoch zwischen ana^{r} - 101 und einem der hier getesteten Genorte, auch nicht mit dem Marker für die Cytochrom b-Defizienz cob^{ts} - 1284.

Tabelle V. Rekombinationshäufigkeiten in Mehrfaktorkreuzungen
unter Einbeziehung von $\text{ana}^r - 101$

ERY	OLI1	OLI2	% Rekombinanten				
			PAR	ANA	COB	OXI3	
11	26	n.d.	20.9	25.5	25	22.2	CAP
	19.3	n.d.	18.4	19.4	n.d.	n.d.	ERY
		n.d.	23.1	23.3	11.6	22.4	OLI1
			18.6	22.6	n.d.	n.d.	OLI2
				22.9	n.d.	n.d.	PAR
					24.2	28.2	ANA
						n.d.	COB

b.) Genetische Lokalisation der Mutation $\text{fun}^r - 202$ und $\text{mik}^r - 1$
auf dem mitochondrialen Genom

Die Mutationen $\text{ana}^r - 101$, $\text{fun}^r - 202$ und $\text{mik}^r - 1$ werden untereinander gekreuzt, um die Kopplungsbeziehungen dieser 3 Marker zueinander zu bestimmen. Zwischen $\text{ana}^r - 101$ und $\text{fun}^r - 202$ findet sich 1 Rekombinante unter 310, zwischen $\text{ana}^r - 101$ und $\text{mik}^r - 1$ keine unter 257 Kolonien. Alle 3 Mutationsorte sind also sehr nahe benachbart. Auf Grund der sehr geringen Rekombinationshäufigkeiten kann aus diesen Versuchen nicht auf die Lagebeziehung der 3 Marker zueinander geschlossen werden.

IV. DISKUSSION

Bevor die Ergebnisse der biochemischen Untersuchungen diskutiert werden, soll zunächst auf grundlegende Theorien über die Funktion des bc_1 -Segments eingegangen werden. Der überwiegende Teil der publizierten Modelle wurde aus den Wirkungen des Antimycin auf diesen Atmungskettenkomplex abgeleitet; die Wirkung anderer Hemmstoffe des bc_1 -Segments ist weitgehend unerforscht. So beziehen sich theoretische Kontroversen im wesentlichen auf die Erklärung der zwei folgenden Phänomene:

- a) die erhöhte Reduzierbarkeit der b -Cytochrome Antimycin-behandelter mitochondrialer Partikel;
- b) die Form von Antimycin-Hemmkurven, die je nach verwendetem Substrat und Testsystem linear bzw. sigmoidal ist.

Unklarheit besteht ausserdem über die Anzahl funktionell verschiedener b -Cytochrome, sowie deren Anordnung im Elektronenfluss.

Zu a) : Die zusätzliche Reduktion der b -Cytochrome (verkürzt als "Extrareduktion" bezeichnet) in Substrat-reduzierten Mitochondrien nach Zugabe von Antimycin wurde erstmals von Chance und Williams (1) beschrieben. Die Ausprägung der Extrareduktion hat die Anwesenheit von Sauerstoff als Oxidationsmittel zur Voraussetzung (7). Da das Redoxpotential des zusätzlich reduzierten Cytochromanteils ebenfalls durch Antimycin in Gegenwart von Sauerstoff positiver wird (60), könnte diese Potentialverschiebung die Ursache der zusätzlichen Reduktion des Cytochrom b sein. Diese Interpretation ist jedoch insofern unbefriedigend, als die Extrareduktion nicht proportional zur Antimycinkonzentration wächst (8, 15; s. auch Figur 28).

Wikström und Berden (18) erklären die sigmoidale Abhängigkeit der Extrareduktion von der Antimycinkonzentration mit einem gespaltenen Elektronenfluss. Nach diesem Modell ist der eine Ast des Elektronen-

flusses im bc_1 - Segment Antimycin-hemmbar, trägt die b -Cytochrome und wird durch Elektronen aus der Reaktion



gespeist. Der zweite Ast des Elektronenflusses, der mit Dimercapto-
propanol (BAL) hemmbar und cytochrom-frei sein soll, entnimmt
die Elektronen dem QH^+ , das dadurch zu Ubichinon oxidiert wird.
Nach Antimycinhemmung fließen die Elektronen über den zweiten
Elektronentransportweg weiter, sodass sich - wie die Autoren an-
nehmen - das Gleichgewicht zwischen QH_2 und QH^+ so verschiebt,
dass QH^+ aus QH_2 unter Abgabe eines Elektrons auf die b -Cytochrome
(= Extrareduktion) nachgebildet wird.

Diese Hypothese wurde angezweifelt, da QH^+ instabil sei und zu rasch
disproportioniere (61). Ausserdem ist dieses Modell für Hefe unzu-
treffend, da, wie bei den von Wikström und Berden untersuchten Rin-
derherzmitochondrien, eine Hemmung der Atmungsaktivität mit BAL
nicht beobachtet wird. (62)

zu b): Die Form von Antimycin-Hemmkurven, die je nach dem im
Enzymtest gemessenen Atmungskettenabschnitt (z. B. Succinatoxi-
dase oder QH_2 -2 : Cytochrom c - Oxidoreduktase) sigmoidal oder li-
near verläuft, ist auf die unterschiedlichsten Weisen erklärt worden:

- 1.) durch allosterische Wirkung des Antimycin auf das bc_1 - Seg-
ment (15)
- 2.) mit oben angeführtem kinetischen Modell eines gespaltenen
Elektronentransports und einer Antimycin-Hemmstelle (18)
- 3.) unter Annahme eines gespaltenen Elektronentransports mit
zwei funktionell verschiedenen Antimycinwirkorten bei
Sch. p. (16)
- 4.) durch einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt (Ubi-
chinonpool) vor der Antimycin-Hemmstelle (21, 63).

Eine zusätzliche Erklärungsmöglichkeit, die bisher nicht als Alter-
native diskutiert wird, aber doch eine gewisse Wahrscheinlichkeit

besitzt (40, s. auch Fussnote S. 54), unterstellt als Grund sigmoidaler Hemmkurven Präparationsartefakte, die sich bei einem so komplex aufgebauten Enzymsystem wie der Atmungskette nur schwer vermeiden lassen (37). Da ausserdem die Untersuchungen, denen die angesprochenen Theorien zugrunde liegen, nicht nur mit verschiedenen Präparationsmethoden mitochondrialer Partikel, sondern auch mit unterschiedlichen Organismen (Rind, S.c., Sch. p.) ausgeführt wurden, ist die Allgemeingültigkeit solcher Aussagen zweifelhaft.

Bislang gibt es bei S.c. und Sch. p. lediglich Befunde, die für die Annahme eines diffundiblen Ubichonpools sprechen, der die Geschwindigkeit des Elektronentransports reguliert (21, 63): die Zugabe synthetischer oxidierten Ubichinone (Q-2 oder Q-3) zu mitochondrialen Partikeln erhöht deren Atmungsaktivität (37, 40). Daher wird im folgenden nur auf die Theorie über die Wirkungsweise des Ubichinon näher eingegangen.

Nach Kröger und Klingenberg (21, 63) ist Ubichinon ein frei diffundibler Elektronenüberträger zwischen den statistisch verteilten Dehydrogenasen und den Cytochromketten. Der erste Reaktionsschritt an den Dehydrogenasen ($Q + 2H \rightarrow QH_2$) ist geschwindigkeitslimitierend für die Gesamtreaktion (z.B. der Succinoxidase). Am zweiten Schritt im bc_1 -Segment ($b^{3+} \rightarrow b^{2+}$) greift Antimycin an und wird bei niederen Konzentrationen solange keine Wirkung zeigen, wie Ubichinol durch noch ungehemmte Cytochromketten oxidiert werden kann. Erst wenn durch höhere Hemmstoffkonzentrationen die Reaktionsgeschwindigkeit des zweiten Schritts auf die des ersten abgefallen ist, tritt eine Abnahme in der Geschwindigkeit der Gesamtreaktion auf. Die Voraussetzung dieser Interpretation, die freie Beweglichkeit der Ubichinonmoleküle zwischen den an der Reaktion beteiligten Enzymkomplexen ist jedoch experimentell noch nicht erwiesen. Die Leichtigkeit der Extraktion von Ubichinon aus Mitochondrien (3-5) sowie die Stimulation der Atmungsaktivität mitochondrialer Partikel nach Zugabe synthetischer Ubichinone deutet auf die Poolfunktion des natürlichen Q-6 hin. Doch ist auch denkbar, dass die Aktivitätssteigerung auf der Verdrän-

gung des natürlichen Q-6 durch ggf. aktivere synthetische Ubichinone beruht. Als Komplikation kommt hinzu, dass synthetische Ubichinone die Wirkung verschiedener Hemmstoffe im bc_1 -Segment herabsetzen (16, 20, 64). Dass es sich dabei, zumindest im Falle von Antimycin, um einen kompetitiven Effekt und nicht um eine Abschirmung der Bindungsstelle durch Ubichinon oder eine Erhöhung der Elektronentransportrate durch Umgehung der Antimycinbindungsstelle handelt, ist daraus ersichtlich,

- a) dass in Resistenzmutanten gegen Antimycin sowohl die Ausprägung der Antimycinhemmung durch zugesetztes synthetisches Ubichinon vermindert werden kann, als auch eine bereits bestehende Antimycinhemmung rückgängig gemacht werden kann und
- b) dass die Atmungsaktivität mitochondrialer Partikel mit und ohne Ubichinonzusatz in demselben Ausmass, aber mit unterschiedlichen Antimycinkonzentrationen hemmbar ist (s. z. B. diese Arbeit S.57 Figur 27).

Die Erklärung sigmoidaler Hemmkurven nach der Theorie von Kröger und Klingenberg mag daher für Organismen oder Hefestämme richtig sein, die Antimycin so fest binden, dass es durch Ubichinon nicht verdrängbar ist. In Antimycin-resistenten Mutanten gilt dieser Mechanismus nur noch beschränkt. In jedem Fall aber vermag der kinetische Mechanismus eines diffundiblen Ubichinonpools nicht alleine zu erklären, warum eine zusätzliche Reduktion der b -Cytochrome nach Antimycinzugabe im anaeroben Zustand (fehlender Elektronenfluss) bestehen bleibt und dass die Titration dieser Extrareduktion mit Antimycin bei Rinderherz- und Hefewildtypmitochondrien zudem sigmoidale Kurven ergibt. Beide Beobachtungen entziehen sich bisher einer plausiblen, experimentell gesicherten Begründung.

Andere Autoren postulieren, dass sigmoidale Antimycin-Effektkurven (15, 22, 65), wie die Tatsache, dass Antimycin sowohl den Elektronenfluss von den b -Cytochromen zum Cytochrom c wie zum Ubichinon blockiert (24), durch Konformationsumwandlung der b -Cytochrome

begründet sein könnten. Dass die Atmungskettenkomponenten funktionsbedingten Konformationsumwandlungen unterliegen, wird kaum bezweifelt. Doch wurde der Nachweis, inwieweit sie eine Rolle für die Funktion der Atmungskette spielen, nur indirekt erschlossen und nicht durch Untersuchungen der Enzymstrukturen erbracht (15, 22, 24, 40, 65).

Eine Hypothese (19), die ebenfalls nicht auf experimentell gesicherten Voraussetzungen beruht, nimmt verschiedene Ubichinonwirkorte im bc_1 -Segment der Atmungskette an. Ein Anhaltspunkt für die Richtigkeit dieser Spekulation könnten die in dieser Arbeit beschriebenen und im folgenden diskutierten Experimente sein, die zeigen, dass Ubichinon die Wirkung von Antimycin, Funiculosin, Dibucain und HQNO vermindert, obwohl alle Hemmstoffe an unterschiedlichen Wirkorten der Atmungskette anzugreifen scheinen.

1.) Die Wirkungsweise von Dibucain, HQNO, Funiculosin und Antimycin bei Sch. p. Wildtyp und S. c. Wildtyp

a.) Dibucain

Dass Dibucain neben der Phospholipase A_2 (55) und der Valinomycin-vermittelten K^+ -Diffusion in Rattenlebermitochondrien (66) auch den Elektronentransport im bc_1 -Segment der Atmungskette von Hefe hemmt, war bisher nicht bekannt.

Dibucain ruft, — wie Antimycin —, eine zusätzliche Reduktion von Cytochrom b hervor. Im Extrareduktionspektrum ist die langwellige Absorptionsbande wesentlich niedriger als die entsprechenden Spektren mit HQNO oder Antimycin und zeigt bei tiefer Temperatur ($77^\circ K$) und bei Raumtemperatur eine ausgeprägte doppelte Absorptionsbande (562 nm und 553 nm ($77^\circ K$) bzw. 567 nm und 557 nm ($22^\circ C$)), die von der Lage her dem bei höheren Organismen vorkommenden Cytochrom b_T (doppelte Absorptionsbande bei 556 nm und 558 nm bei Raumtemperatur) ähnlich ist (8, 13, 18). Bisher konnte dieses Cytochrom b bei Sch. p. nicht nachgewiesen werden, da die Reduktionsbedingungen, bei denen es selektiv reduziert werden kann, nicht bekannt waren. Ob das bei Sch. p. erhaltene Spektrum durch mehr als nur eine

Komponente hervorgerufen wird, kann erst anhand potentiometrischer Messungen entschieden werden. Zumindest lässt sich hier feststellen, dass zum Extrareduktionsspektrum mit Antimycin mehr als nur eine Cytochrom b -Spezies beiträgt, da sowohl keine klare Trennung der beiden Absorptionsmaxima, — wie es für Extrareduktionsspektren mit Dibucain zutrifft —, erkennbar ist, als auch, dass die langwellige Absorptionsbande dieser Spektren mit Antimycin höher ist als mit Dibucain.

Aus den Tieftemperaturspektren ist dies in gleicher Weise ersichtlich. Da in Gegenwart von Antimycin mehr b-Cytochrome zusätzlich reduziert werden können, ist es denkbar, dass der Wirkort von Dibucain weiter auf der Substratseite des bc₁ - Segments liegt, als der von Antimycin.

Auch bei der Hemmung des Elektronentransports mit Dibucain ergeben sich Unterschiede, ob Succinat oder NADH als Substrat fungiert: Die Succinat-Oxidase spricht schlechter auf Dibucain an als die NADH -Oxidase. Bei der Extrareduktion waren die Verhältnisse genau umgekehrt: Sie kann mit Succinat als Substrat erzielt werden, nicht aber mit NADH.

Diese gegensätzlichen Ergebnisse lassen einen komplexen Mechanismus der Wirkung von Dibucain vermuten. Vielleicht existieren auch zwei Bindungsorte mit unterschiedlichen Dissoziationskonstanten, worauf die Unterschiede in der Wirksamkeit von Ubichinon-3 auf die Dibucainhemmung der NADH- und der Succinat-Oxidase hinweisen.

Eine Entscheidung hierüber wird erst die Charakterisierung Dibucain-resistenter Mutanten erbringen können, weil ein Bindungstest mit Dibucain mit den vorhandenen Mitteln technisch noch nicht ausführbar ist.

Beim Vergleich der Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung des Elektronentransports und der Extrareduktion von Dibucain — beides Experimente mit dem Substrat Succinat — fällt folgendes auf:

Um die Oxidase-Aktivität um die Hälfte zu verringern, ist etwa die 50-fache Konzentration an Dibucain notwendig, wie für die 50 %ige Ausprägung der Extrareduktion.

Da diese unterschiedliche Wirksamkeit des Hemmstoffs in verschiedenen experimentellen Systemen keine Besonderheit von Dibucain ist, sondern bei den anderen verwendeten Inhibitoren ähnliche Verhältnisse auftreten, wird dieser Punkt anschliessend an die Behandlung der einzelnen Hemmstoffe zusammenfassend diskutiert (s.S. 76).

b.) HQNO

Auch HQNO ruft eine zusätzliche Reduktion von b-Typ-Cytochrom hervor. Die Differenz der Wirkungen von Antimycin und HQNO auf die Extrareduktion hat ein Maximum bei 564 nm (Raumtemperatur). Hierbei handelt es sich höchstwahrscheinlich um eine einzelne Absorptionsbande und nicht um ein gemischtes Absorptionsspektrum von Cytochrom b_K und b_T. Eine ähnliche Komponente mit einer Absorptionsbande bei 563 nm (Raumtemperatur) wurde bereits bei C. utilis nachgewiesen (12). Neuere potentiometrische Untersuchungen bei Sch. p. bestätigen, dass ein b-Cytochrom mit einer Absorptionsbande bei 564 nm (Raumtemperatur) existiert (67), das im folgenden entsprechend der gängigen Nomenklatur nach dem Absorptionsmaximum der α -Bande bei Raumtemperatur als Cytochrom b₅₆₄ bezeichnet wird. (Cytochrom b_T bei Sch. p. ist dann entsprechend Cytochrom b₅₆₇.)

Es ist fraglich, ob das Spektrum mit einem Maximum bei 562 - 563 nm (Raumtemperatur), das nach Reduktion mitochondrialer Partikel mit endogenem Substrat nach HQNO- oder Antimycinzugabe ⁺ (s.S. 74) erscheint, das Cytochrom b₅₆₂ (Cytochrom b_K) bei Sch. p. ist. Die entsprechenden Spektren bei 77°K, die 2 Absorptionsmaxima bei 559 nm und 555 nm aufweisen, bestätigen diese Zweifel, denn ein b-Cytochrom mit einer solchen Doppelbande wurde für Eukaryonten bisher noch

nicht beschrieben. Da das Cytochrom b_{567} (562 nm bei 77°K) unter diesen Bedingungen praktisch nicht reduziert wird (Fig. 24), liegt es nahe, sich dieses Spektrum aus zwei b -Cytochromen mit Absorptionsmaxima von ca. 554 und 560 nm (77°K) und entsprechend ca. 560 und 564 nm bei Raumtemperatur zusammengesetzt zu denken. Ein b -Cytochrom mit einem Absorptionsmaximum bei 564 nm (Raumtemperatur) ist bereits aus anderen Untersuchungen bei Sch. p. postuliert worden (s.S. 29 und (67)), jedoch noch nicht ein solches mit einem Absorptionsmaximum bei etwa 560 nm (Raumtemperatur) bzw. 554 nm (77°K).

In der Hemmung der Succinat- und NADH-Oxidase zeigen sich keine Unterschiede der Sensibilität gegen HQNO. Dieser Sachverhalt, sowie die Existenz nur einer hochaffinen Bindungsstelle für HQNO macht diesen Hemmstoff geeignet für eine exemplarische Untersuchung des Einflusses des Redoxzustandes der Atmungskette (anaerob, steady-state und oxidiert) auf die Wirksamkeit eines Inhibitors.

In der Absättigung der spezifischen Bindungsstelle, in der Extrareduktion und in der Hemmung ergeben sich weitaus deutlichere Unterschiede der Effektivität als bei Antimycin. Da sich die Versuchsbedingungen bezüglich des Redoxzustandes der mitochondrialen Partikel unterscheiden, hängt die Wirksamkeit des HQNO offenbar von dem Redoxzustand ab. Die Effektivität von HQNO nimmt in der fol-

+) Eine weitere, hier unberücksichtigte Komplikation ergibt sich daraus, dass nach Bindung von Antimycin an mitochondriale Partikel eine Verschiebung der Cytochrom b - Absorption in den rotwelligen Bereich (um ca. 1-2 nm) erfolgt (46). Über den Mechanismus dieses Effekts besteht keine befriedigende Erklärung (s. dazu auch in einem kürzlich erschienenen Reviewartikel von J. S. Rieske (9), S. 215 "Reported shifts of cytochrome b spectral bands induced by antimycin should be accepted with reservations until uncertainties regarding the effect of antimycin on the redox properties of different spectral species of cytochrome b are settled.").

genden Reihenfolge zu: Fliessgleichgewicht (Oxidasetest), anaerober Zustand (Extrareduktion) und oxidierte Partikel (Bindungstest). Welcher Mechanismus diesen Tatbeständen zugrunde liegt und welche Komponente der Gegenspieler des Hemmstoffs sein könnte, wird gemeinsam für alle verwendeten Inhibitoren unter Punkt d.) diskutiert.

c.) Funiculosin und Antimycin

Die Vermutung, dass es sich bei Funiculosin und Antimycin um analoge Hemmstoffe des $\underline{bc}_1$ -Segments handeln könnte (54), ist aufgrund der genetischen Untersuchungen auszuschliessen (s.u.). Die weiter behauptete Gemeinsamkeit dieser Hemmstoffe, die sigmoidale Form ihrer Hemmkurven (54), ist aus folgenden Gründen problematisch: Während sigmoidale Antimycin-Hemmkurven bei S.c. auf Präparationsartefakte zurückzuführen sind (s. S. 52), zeigt Funiculosin eine aussergewöhnlich langsame Gleichgewichtseinstellung in der Hemmung der NADH-Oxidase, insbesondere bei geringen Funiculosinkonzentrationen. Deshalb können durch versuchstechnische Fehler sigmoidale Hemmkurven auftreten. Bei ausreichend langen Wartezeiten für jeden Messpunkt ergibt sich bei S.c. eine hyperbolische Funiculosin-Hemmkurve.

Für die Ausprägung der zusätzlichen $\underline{b}$ -Cytochrom-Reduktion durch Funiculosin ist, anders als bei Antimycin, Elektronenfluss über eine KCN-hemmbar Komponente notwendig. Die Differenz der Extrareduktionsspektren mit Funiculosin und Antimycin zeigt, dass in Gegenwart von Funiculosin ein weiteres $\underline{b}$ -Cytochrom mit einem Absorptionsmaximum bei 557 nm (Raumtemperatur), reduziert wird. Es deutet sich somit an, dass der Wirkort von Funiculosin sauerstoffseitig vom Antimycin liegt. Die durch Funiculosin zusätzlich reduzierbare Cytochrom $\underline{b}$ -Spezies, Cytochrom $\underline{b}_{557}$, dürfte mit dem durch Ubichinol-3 reduzierbaren $\underline{b}$ -Cytochrom (10) identisch sein.

Die Diskussion über die Zuordnung der $\underline{b}$ -Cytochrome zu Absorptions-

banden und die Bedingungen ihrer selektiven Reduktion ist in Tabelle VI zusammengefasst.

Tabelle VI.

Cytochrom	Absorptionsbanden		selektive Reduktionsbedingung
	25°C	77°K	
b ₅₆₇	567, 557	562, 553	(Succinat + Dibucain + KCN) - - (Succinat + KCN)
b ₅₆₄	564	560	(NADH + Succinat + KCN + Antimycin) - - (NADH + Succinat + KCN + HQNO)
b ₅₆₀	560	554, 5	(endogene Substrate + HQNO oder Antimycin) - (oxidiert)
b ₅₅₇	557	553	(QH ₂ -3 + Antimycin + KCN) - - (oxidiert)
			oder
			(NADH + KCN + Funiculosin) - - (NADH + KCN + Antimycin)

d.) Kompetitive Wirkung von Ubichinon und Hemmstoffen des
bc₁- Segments der Atmungskette

Bei der Diskussion über die Hemmstoffe Dibucain, HQNO und Funiculosin wurde angesprochen, dass die Wirksamkeit dieser Inhibitoren

abhängig vom Redoxzustand der mitochondrialen Partikel ist. Unter oxidierten Bedingungen (wie im Bindungstest) ist die Effektivität am höchsten, unter anaeroben Bedingungen (Extrareduktion) geringer und unter Fließgleichgewichtsbedingungen am geringsten.

Dieselbe Abhängigkeit wurde bereits bei Antimycin beobachtet und folgendermassen erklärt (16):

Q-3 ist fähig, die Wirkung von Antimycin (in ana^r - 8) rückgängig zu machen. Deshalb könnte das endogene Q-6 ebenfalls diese Eigenschaft besitzen; insbesondere eine reduzierte Form desselben, da Antimycin im Bindungstest mit oxidierten Partikeln fester bindet als aus der Hemmung der Atmungskette mit Antimycin (Fließgleichgewichtsreduktion) zu schliessen wäre.

Wie insbesondere die Untersuchungen mit HQNO zeigen, könnte die jeweilige Stärke des Antagonismus zwischen Hemmstoff und reduziertem Q unter verschiedenen Redoxzuständen der mitochondrialen Partikel die jeweilige Konzentration des Gegenspielers des Inhibitors widerspiegeln: Die reduzierte Form von Q-6, die während des Elektronenflusses in höchster und im oxidierten Zustand der Atmungskette in geringster Konzentration vorkommt, ist das QH' , das in stabiler Form nachgewiesen werden konnte (68, 69).

Die oxidierte Form von Q schliesst sich schon deshalb aus, weil oxidiertes Q-3, dem Bindungstest zugesetzt, die 'apparent' Dissoziationskonstante des Antimycin-Protein-Komplexes nicht verändert (62).

Wie ist aber der Mechanismus vorzustellen, dass Q als Elektronendonator des bc_1 -Segments fungiert, gleichzeitig aber mit Hemmstoffen, die an unterschiedlichen Stellen des bc_1 -Segments angreifen, konkurriert?

Eine Möglichkeit wäre, dass Ubichinon (bzw. QH') eine Konformationsumwandlung des Komplexes III induziert, wodurch die Bindungsfestigkeit aller hier untersuchter Hemmstoffe herabgesetzt würde. -

Oder Ubichinon besitzt, ähnlich der Hypothese von Mitchell (19), mehrere Wirkorte für Ubichinon im Bereich des bc_1 -Segments. In Verbindung mit der Theorie, dass Ubichinon ein diffundibler Elektronenüberträger zwischen den Dehydrogenasen und dem bc_1 -Segment ist und ein geschwindigkeitslimitierender Schritt vor dem bc_1 -Segment liegt (21), lässt sich dann erklären, weshalb das endogene Q-6 der Mitochondrien in ca. 10 - 20-fachem Überschuss zum bc_1 -Segment vorliegt (3).

Im Zusammenhang mit dem Ubichinonpool lassen sich auch die Ursachen der Atmungshemmung in Gegenwart von zwei Substraten diskutieren. Das Ergebnis, dass die NADH-Oxidase von Sch. p. durch Succinat um ca. 10 % vermindert wird und die Wirkung von Antimycin verstärkt wird, stützt die Theorie eines diffundiblen Ubichinonpools. Da die maximale Atmungsaktivität bei Hefe nur in dem NADH-Oxidase-System zu erreichen ist, könnte durch gleichzeitiges Einschalten der im Elektronentransport weniger effizienten Succinatoxidase eine Verringerung der Konzentration des reduzierten Ubichinon und damit eine Verminderung der Elektronentransportrate und der Konzentration des mit dem Hemmstoff konkurrierenden QH^+ eintreten.

2.) Genetische und biochemische Charakterisierung der Mutanten

Die Untersuchungen der verschiedenen in vitro resistenten Mutanten bestätigen die im vorigen Abschnitt diskutierten biochemischen Ergebnisse: Alle vier Hemmstoffe (Antimycin, Dibucain, Funiculosin, HQNO) besitzen unterschiedliche Wirkung. Da eine teilweise, gestoppelte in vitro - Resistenz zwischen zwei Hemmstoffen nicht für alle Mutanten der entsprechenden Resistenztypen auftritt (Tabelle VII).

Tabelle VII. Resistenzverhalten einiger Mutanten von S. c. und Sch. p.

	<u>in vivo</u>	
	Antimycin	Funiculosin
ana ^r - 101 (<u>S. c.</u>)	+++	—
fun ^r - 202 (<u>S. c.</u>)	++	+++
mik ^r - 1 (<u>S. c.</u>)	++	++
ana ^r - 8 (<u>Sch. p.</u>)	++++	+++

	<u>in vitro</u> (NADH- Oxidase)			
	Antimycin	Funiculosin	HQNO	Dibucain
ana ^r - 101 (<u>S. c.</u>)	+++	—	+++	—
fun ^r - 202 (<u>S. c.</u>)	—	+++	—	—
mik ^r - 1 (<u>S. c.</u>)	—	+++	—	—
ana ^r - 8 (<u>Sch. p.</u>)	++++	++	—	—

(+) ... (++++): Resistenzgrad; (—): sensitiv, verglichen mit dem Wildtyp

Analog zu Antimycin-resistenten Mutanten bei Candida utilis (29, 30) ist die Antimycin-resistente Mutante ana^r - 101 bei S. c. kreuzresistent gegen HQNO. Das Vorhandensein zweier Antimycin-resistenter, gleichzeitig jedoch HQNO-sensibler Mutanten bei Sch. p. beweist, in Übereinstimmung mit den spektroskopischen Untersuchungen des Wildtyps von Sch. p., dass die Wirkungen von HQNO und Antimycin zumindest in diesem Organismus unterschiedlich sind. Verallgemeinerungen über Gemeinsamkeiten aber auch Verschiedenheiten der HQNO - Antimycin-Bindungsstellen sind daher selbst für die Atmungskette dieser beiden Hefen noch unzulässig.

Ein Ergebnis, das als Resultat der genetischen Untersuchungen bei Saccharomyces cerevisiae formuliert werden

kann, ist, dass aufgrund der hohen Rekombinationswahrscheinlichkeit zwischen den Markern cob^{ts} -1284 (Cytochrom b-Defizienz) und ana^{r} -101 bei S.c. eventuell zwei verschiedene mitochondriale Gene für Antimycinresistenz und Cytochrom b-Defizienz existieren, es also mehr als eine mitochondrial codierte Komponente für das bc₁-Segment gibt.

V. ZUSAMMENFASSUNG

- 1.) Zwei Mutanten von S. c., die im bc₁-Segment der Atmungskette verändert sind, wurden isoliert: ana^r-101, in vitro resistent gegen Antimycin, und fun^r-202, in vitro resistent gegen Funiculosin. Wie aus den Rekombinationsanalysen hervorgeht, werden die Mutationen ana^r-101 und fun^r-202 mitochondrial vererbt. Die Mutationsorte sind untereinander stark gekoppelt, nicht jedoch mit dem Marker für Cytochrom b-Defizienz cob^{ts}-1284.
- 2.) Beide Mutanten wurden in vivo und in vitro unter Verwendung von 4 Hemmstoffen des Elektronentransports im bc₁-Segment charakterisiert: Antimycin, HQNO, Dibucain und Funiculosin.
- 3.) Die Mutanten ana^r-8 und mik^r-1 wurden denselben Untersuchungen unterzogen und mit den beiden von mir isolierten Mutanten von S.c. verglichen. Das Resultat ist,
 - a) dass Antimycin-resistente Mutanten von Sch. p. nicht kreuzresistent gegen HQNO sind, woraus geschlossen wird, dass HQNO und Antimycin bei diesem Organismus einen verschiedenen Wirkort besitzen,
 - b) dass Funiculosin-resistente Mutanten bei S.c. nicht in vitro kreuzresistent gegen HQNO und Antimycin sind.Keine der Mutanten ist kreuzresistent gegen Dibucain. Folglich haben alle vier verwendeten Hemmstoffe einen anderen Wirkort zwischen Cytochrom b und c₁.
- 4.) Obwohl Antimycin, Dibucain, Funiculosin und HQNO an verschiedenen Stellen des bc₁-Segments angreifen, verringert Ubichinon-3 die Wirkung dieser Hemmstoffe, ohne einen "by-pass" zu initiieren.

- 5.) Es wurde beobachtet, dass Succinat die Aktivität der NADH-Oxidase um ca. 10 % vermindert und die Hemmwirkung von HQNO und Antimycin verstärkt. Beide Phänomene lassen sich mit einem limitierenden Ubichinonpool erklären.
- 6.) Dibucain hemmt den Elektronenfluss im bc₁-Segment der Atmungskette von S. c. und Sch. p.
- 7.) Dibucain erzeugt wie die anderen untersuchten Hemmstoffe eine zusätzliche Reduktion von b-Typ-Cytochrom. Die Effektivität des Hemmstoffes ist in der Extrareduktion der b-Cytochrome und der Hemmung der Oxidaseaktivitäten vom verwendeten Substrat abhängig.
- 8.) Bei oxidierten mitochondrialen Partikeln von Sch. p. konnte eine spezifische Bindungsstelle für HQNO nachgewiesen werden. Es wird diskutiert, dass die unterschiedliche Wirksamkeit dieses Hemmstoffes in Bindung, Hemmung und Extrareduktion auf unterschiedliche Konzentration an QH[•] in den verschiedenen Experimenten beruhen könnte.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Chance, B. und Williams, G.R. (1955)
"The respiratory chain and oxidative phosphorylation"
Adv. Enzymol. 17, 65 - 134
- (2) Katan, M.B. (1976)
"Comparative immunological and electrophoretic studies of
the cytochrome bc_1 complex of different organisms"
In "Genetics, Biogenesis and Bioenergetics of Mitochondria",
Bandlow et al. (eds.), Seite 279 - 288
Walter de Gruyter, Berlin, New York
- (3) Kröger, A. und Klingenberg, M. (1970)
"Quinones and nicotinamide nucleotides associated with
electron transfer"
Vitamines and Hormones 28, 533 - 573
- (4) Norling, B., Glazek, E., Nelson, B.D. und Ernster, L. (1974)
"Studies with ubiquinones-depleted submitochondrial particles"
Eur. J. Biochem. 47, 457 - 482
- (5) de Kok, J. (1975)
"The respiratory chain in a ubiquinone-deficient mutant
of *S. cerevisiae*."
Biochim. Biophys. Acta 376, 27 - 41
- (6) Lang, B., Burger, G., Wolf, K., Bandlow, W. und
Kaudewitz, F. (1976)
"Characterization of respiratory-deficient and antimycin-
resistant mutants of *Schizosaccharomyces pombe* with
extrachromosomal inheritance."
In "Genetics, Biogenesis and Bioenergetics of Mitochondria",
Bandlow et al. (eds.), Seite 379 - 387,
Walter de Gruyter, Berlin, New York

(7) Slater, E.C. (1973)

"The mechanism of action of the respiratory inhibitor antimycin."

Biochim. Biophys. Acta 301, 129 - 153

(8) Wikström, M.K.F. (1973)

"The different cytochrome b components in the respiratory chain of animal mitochondria and their role in electron transport and energy conservation"

Biochim. Biophys. Acta 301, 155 - 193

(9) Rieske, J.S. (1976)

"Composition, structure, and function of complex III of the respiratory chain"

Biochim. Biophys. Acta 456, 195 - 247

(10) Burger, G., Lang, B., Bandlow, W. und Kaudewitz, F. (1975)

"Studies on the mechanism of electron transport in the bc₁- segment of the respiratory chain in yeast.

II. The binding of antimycin to mitochondrial particles and the function of two different binding sites."

Biochim. Biophys. Acta 396, 189 - 201

(11) Weiss, H., Ziganke, B. und Kolb, H.J. (1976)

"Subunit structure and biogenesis of cytochrome b from neurospora crassa mitochondria"

In "Genetics, Biogenesis and Bioenergetics of Mitochondria

Bandlow et al. (eds.), Seite 289 - 302

Walter de Gruyter, Berlin, New York

(12) Sato, N., Ohnishi, T. und Chance, B. (1972)

"Spectral study of b cytochromes in yeast mitochondria and intact cells"

Biochim. Biophys. Acta 275, 288 - 297

- (13) Sato, N., Wilson, D.F. und Chance, B. (1971)
"The spectral properties of the b cytochromes in intact mitochondria"
Biochim. Biophys. Acta 253, 88 - 97
- (14) Phelps, D.C. and Crane, F.L. (1974)
"Spectral resolution of 4 Cytochrom b components in mitochondria"
Biochem. Biophys. Res. Commun. 60, 576 - 581
- (15) Berden, J.A. und Slater, E.C. (1972)
"The allosteric binding of antimycin to cytochrome b in the mitochondrial membrane."
Biochim. Biophys. Acta 256, 199 - 215
- (16) Lang, B., Burger, G., Wolf, K., Bandlow, W. und Kaudewitz, F. (1975)
"Studies on the mechanism of electron transport in the bc₁ - segment of the respiratory chain in yeast.
III. Isolation and characterization of an antimycin resistant mutant A N T 8 in Schizosaccharomyces pombe."
Molec. Gen. Genet. 137, 353 - 363
- (17) Norling, B., Nelson, B.D., Nordenbrand, K. und Ernster, L. (1972)
"Evidence for the occurrence in submitochondrial particles of a dual respiratory chain containing different forms of cytochrome b."
Biochim. Biophys. Acta, 275, 18 - 32
- (18) Wikström, M.K.F. und Berden, J. (1972)
"Oxidoreduction of cytochrome b in the presence of antimycin."
Biochim. Biophys. Acta 283, 403 - 420

- (19) Mitchell, P. (1975)

"Protonmotive redox mechanism of the cytochrome bc₁ - complex in the respiratory chain: protonmotive ubiquinone cycle."

FEBS Letters 56, 1 - 6

- (20) Burger, G., Lang, B., Wolf, K., Bandlow, W. und Kaudewitz, F. (1976)

"The inhibitory effect of HQNO compared with extra-reduction and binding in the wild-type and in an antimycin-resistant mutant, ANT^R 8, in Schizosaccharomyces pombe."

In "Genetics, Biogenesis and Bioenergetics of Mitochondria",

Bandlow et al. (eds.), Seite 399 - 407

Walter de Gruyter, Berlin, New York

- (21) Kröger, A. und Klingenberg, M. (1973)

"The kinetics of the redox reactions of ubiquinone related to the electron-transport activity in the respiratory chain."

Eur. J. Biochem. 34, 358 - 368

- (22) von Jagow, G. und Bohrer, C. (1975)

"Inhibition of electron transfer from ferrocyclochrome b to ubiquinone, cytochrome c₁ and duroquinone by antimycin"

Biochim. Biophys. Acta 387, 409 - 424

- (23) Baum, H., Rieske, J.S., Silman, H.I. und Lipton, S.H. (1967)

"On the mechanism of electron transfer in complex III of the electron transfer chain"

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 66, 798 - 805

- (24) Rieske, J.S. (1971)

"Changes in oxidation-reduction potential of cytochrome b observed in the presence of antimycin A"

Arch. Biochem. Biophys. 145, 179 - 193

- (25) Heslot, H., Goffeau, A. und Louis, C. (1970)
"Respiratory metabolism of a "petite-negative" yeast
Schizosaccharomyces pombe 972 h⁻."
- J. Bacteriology 104, 473 - 481
- (26) von Jagow, G. und Klingenberg, M. (1970)
"Pathways of hydrogen in mitochondria of Saccharomyces carlsbergensis"
- Eur. J. Biochem. 12, 583 - 592
- (27) Wolf, K., Burger, G., Lang, B. und Kaudewitz, F. (1976)
"Extrachromosomal inheritance in Schizosaccharomyces pombe.
I. Evidence for an extrakaryotically inherited mutation
conferring resistance to antimycin."
- Molec. Gen. Genet. 144, 67 - 73
- (28) Wolf, K., Lang, B., Burger, G. und Kaudewitz, F. (1976)
"Extrachromosomal inheritance in Schizosaccharomyces pombe.
II. Evidence for extrakaryotically inherited respiratory
deficient mutations."
- Molec. Gen. Genet. 144, 75 - 81
- (29) Butow, R.A. und Zeydel, M. (1968)
"The isolation of an antimycin resistant mutant of
Torulopsis utilis."
- J. Biol. Chem. 243, 2545 - 2549
- (30) Grimmlikhuijzen, C.J.P. und Slater, E.C. (1973)
"Antimycin insensitive mutants of Candida utilis.
I. Isolation and characterization of mutant 28."
- Biochim. Biophys. Acta 305, 67 - 79

- (31) Subik, J. (1975)
"Mucidin-resistant antimycin A-sensitive mitochondrial mutant of Saccharomyces cerevisiae"
FEBS Letters, 59, 273 - 276
- (32) Tzagoloff, A., Akai, A. und Needleman, R.B. (1975)
"Assembly of the mitochondrial membrane system: Isolation of nuclear and cytoplasmic mutants of Saccharomyces cerevisiae with specific lesions in cytochrome oxidase."
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 72, 2054 - 2057
- (33) O'Connor, R.M., McArthur, C.R. and Clark-Walker, G.D. (1975)
"Closed circular DNA from mitochondrial-enriched fractions of four petite-negative yeasts"
Eur. J. Biochem. 53, 137 - 144
- (34) Prunell, A. und Bernardi, G. (1974)
"The mitochondrial genome of wild-type yeast cells. IV. Genes and spacers"
J. Mol. Biol. 86, 825 - 841
- (35) Sherman, F., Stewart, J.W., Maroliash, E., Parker, J. und Campbell, W. (1966)
"The structural gene for yeast cytochrome c"
Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.) 55, 1498 - 1504
- (36) Claisse, M.L. (1969)
"Studies on cytochrome system of yeasts: purification and spectral properties of Schizosaccharomyces pombe cytochrome c."
Yeast Symposium 1969, Antonie van Leeuwenhoek 35, 21 - 22

- (37) Lang, B., Burger, G., Doxiadis, I., Thomas, D.Y.T., Bandlow, W. und Kaudewitz, F. (1977)
 "A simple method for the large-scale preparation of mitochondria from microorganisms."
 Anal. Biochem. 77, 110 - 121
- (38) Bandlow, W. (1974)
 "Characterization of a respiration competent, oligomycin resistant mutant of *Schizosaccharomyces pombe* lacking cytochrome b₅₆₆ but still binding antimycin."
 In "The biogenesis of mitochondria", Academic Press, 1974
- (39) Burger et al., in Vorbereitung
 "Der Effekt der Glucoserepression auf den Elektronenfluss und die b-Cytochrome der Atmungskette bei Schizosaccharomyces pombe."
- (40) Lang, B., Burger, G. und Bandlow, W. (1974)
 "Activity of reduced ubiquinone: cytochrome c oxidoreductase with various ubiquinol-isoprenologues as substrate and corresponding inhibitory effect of antimycin in yeast."
 Biochim. Biophys. Acta 368, 71 - 85
- (41) Trembath, M.K., Molloy, P.L., Sriprakash, K.S., Cutting, G.J., Linnane, A.W. und Lukins, H.B. (1976)
 "Biogenesis of mitochondria 44"
 Molec. Gen. Genet. 145, 43 - 52
- (42) Schweyen, R.J., Steyrer, U. und Kaudewitz, F. (1976)
 "Mapping of mitochondrial genes in Saccharomyces cerevisiae"
 Molec. Gen. Genet. 146, 117 - 132

- (43) Wolf, K., Dujon, B. und Slonimski, P.P. (1973)
"Multifactorial crosses involving a mutation conferring
paromomycin-resistance in Saccharomyces cerevisiae"
Molec. Gen. Genet. 125, 53 - 90
- (44) Backhaus, B. unveröffentlicht
- (45) Schweyen, R.J. unveröffentlicht
- (46) Manhart, R.W. (1975)
"Wirkungen des Antimycins auf den Redoxzustand der
b-Cytochrome der Atmungskette beim Wildtyp der Hefe
Schizosaccharomyces pombe"
Diplomarbeit, Genetisches Institut
- (47) Fletcher, J.E. und Ashbrook, J.D. (1973)
"Computer analysis of drug-protein binding data"
Ann. N.Y. Acad. Sci. 226, 69 - 81
- (48) Rosenthal, H.A. (1967)
"A graphic method for the determination and presentation
of binding parameters in a complex system."
Anal. Biochemistry 20, 525 - 532
- (49) Burger, G., Grami, J. et al., in Vorbereitung
- (50) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, L.A. und Randall, R.J.
(1951)
"Proteinmeasurement with phenol reagent."
J. Biol. Chem. 209, 23 - 29
- (51) Rieske, J.S. (1971)
"Changes in oxidation-reduction potential of cytochrome b
observed in the presence of antimycin A"
Arch. Biochem. Biophys. 145, 179 - 193

- (52) Berden, J. A. und van Ark (1976)

"The binding of 2-n-heptyl-4-hydroxyquinoline-N-oxide to submitochondrial particles and inhibition of electron transport"

In "Genetics, Biogenesis and Bioenergetics of Mitochondria"

Bandlow et al. (eds.), Seite 409 - 418

Walter de Gruyter, Berlin, New York

- (53) Lang, B. unveröffentlichtes Resultat

- (54) Moser, U.K. und Walter, P. (1975)

"Funiculosin: a new specific inhibitor of the respiratory chain in rat liver mitochondria"

FEBS Letters 50, 279 - 282

- (55) Scarpa, A. und Lindsay, G. (1972)

"Maintenance of energy-linked functions in rat-liver mitochondria aged in the presence of nupercaine"

Eur. J. Biochem. 27, 401 - 407

- (56) Lückemann, G., Diplomarbeit, Genetisches Institut (1977)

- (57) Groot Obbink, D.J., Hall, R.M., Linnane, A.W., Lukins, H.B., Monk, B.C., Spithill, T.W. und Trembath, M.K. (1976)

"Mitochondrial genes involved in the determination of mitochondrial membrane proteins"

In "The genetic function of mitochondrial DNA"

Saccone, C. und Kroon, A.M. (eds.), Seite 163 - 173

Elsevier/North Holland Press, Amsterdam, The Netherlands

- (58) Gillham, N.W. (1974)

"Genetic analysis of the chloroplast and mitochondrial genomes"

Ann. Rev. Genet. 8, 347 - 391

- (59) Dujon, B., Slonimski, P.P., Weill, L. (1974)
"Mitochondrial genetics,
VI. A model for recombination and segregation of
mitochondrial genomes in Saccharomyces cerevisiae."
Genetics 78, 415 - 437
- (60) von Jagow, G., persönl. Mitteilung
- (61) Kröger, A. (1976)
"The significance of the radicals of ubiquinone in
electron transport as judged from their chemical properties."
In "Genetics, Biogenesis and Bioenergetics of Mitochondria",
Bandlow et al. (eds.), S. 343 - 351,
Walter de Gruyter, Berlin, New York
- (62) Burger, G., unveröffentlichtes Resultat
- (63) Kröger, A. und Klingenberg, M. (1973)
"Further evidence for the pool function of ubiquinone as
derived from the inhibition of the electron transport by
antimycin."
Eur. J. Biochem. 39, 313 - 323
- (64) Takemori, S. und King, T. (1964) a)
"Coenzyme Q: Reversal of inhibition of succinate:
cytochrome c reductase by lipophilic compounds."
Science 144, 852 - 853
- (65) Brya, K., Kaniuga, Z. und Slater, E.C. (1969)
"Studies on the mechanism of inhibition of the mitochondrial
electron transport by antimycin."
Biochim. Biophys. Acta 189, 317 - 326

- (66) Azzi, A. und Scarpa, A. (1967)
"Inhibition of K^+ transport in liver mitochondria"
Biochim. Biophys. Acta 135, 1087 - 1088
- (67) Manhart, R.W. et al., in Vorbereitung (potentiometrische Untersuchungen)
- (68) Bäckström, D., Norling, B., Ehrenberg, A. und Ernster, L.
(1970)
"Electron spin resonance measurements on ubiquinone-depleted and ubiquinone-replenished submitochondrial particles."
Biochim. Biophys. Acta 197, 108 - 111
- (69) Ruzicka, F.J., Beinert, H., Schieler, K.H., Dunham, W.R. und Sands, R.H. (1975)
"Interaction of ubisemiquinone with a paramagnetic component in heart tissue"
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 72, 2886 - 2890

VII. ANHANG

Das verallgemeinerte Scatchard - Modell (47) lautet:

$$v = \sum_{j=1}^n \frac{N_j K_j c}{1 + K_j c} \quad (1),$$

wobei v : = Anzahl von gebundenen Ligandenmolekülen pro Makromolekül ⁺⁾ , (molares Verhältnis)

c : = Konzentration des freien Liganden

n : = Zahl der Bindungsklassen ⁺⁺⁾ des Makromoleküls

K_j : = Assoziationskonstante der Bindungsklasse j

N_j : = Zahl der Bindungsstellen ⁺⁺⁾ in der Klasse j

1. Hemmkurve

$$\text{Da } v = \sum_{j=1}^n v_j \quad (2),$$

wobei v_j : = an die Klasse j gebundener Ligand, ist

$$v_j = \frac{N_j K_j c}{1 + K_j c} \quad (3).$$

Der besetzte Anteil der Klasse j ist v_j / N_j ,

und der freie Anteil der Klasse j ist

$$1 - \frac{v_j}{N_j} = \frac{1}{1 + K_j c} \quad (4) = : Y_j.$$

⁺⁾ Dies wurde bei löslichen Enzymen angewandt, deren Molekulargewicht bekannt ist (47). Da im Falle der Atmungskette das Molekulargewicht jedoch unbekannt ist, wurde v und N in mol pro Protein angegeben.

⁺⁺⁾ s. S. 95

Ist die Klasse j für den Elektronentransport verantwortlich, dann

ist $Y_j =$ Aktivität.

Die Konzentration des totalen Liganden ist $c + v' = : X$,

wobei v' die Konzentration des gebundenen Liganden ist ⁺⁺⁺⁾.

$Y_j = f(X)$ ist also die Hemmkurve.

2. Bindungskurve

Aus den experimentell bestimmten Variablen c und v werden anhand eines Computerprogramms die "best fit" Parameter $N_1, N_2, \dots$ und $K_1, K_2, \dots$ bestimmt. Die Bindungsfunktion mit diesen Parametern wird über die experimentell bestimmten Daten gezeichnet, um die Qualität der Übereinstimmung anschaulich zu machen.

++) In der vorliegenden Arbeit wird j als Zahl der Bindungsstellen und N_j als Konzentration der Bindungsstelle j bezeichnet.

+++)) Wie bei den experimentellen Hemmkurven wird bei den theoretischen Hemmkurven die Hemmstoffkonzentration pro mg Protein aufgetragen: $(c + v') / c_p$.
($c_p =$ Konzentration des Proteins in mg/ml).

Lebenslauf .

Ich wurde am 21.3.1949 in Grönwohld (Schleswig-Holstein) geboren. Mein Vater ist Hauptschullehrer, meine Mutter Kosmetikberaterin. In Mielkendorf (bei Kiel) besuchte ich für 4 Jahre die Grundschule, danach ein Gymnasium in Kiel und absolvierte im Juni 1967 das Abitur.

Dann studierte ich 2 Semester in Kiel und die folgenden Semester in München Biologie, erhielt 1975 das Diplom in Biologie und schloss meine 1972 im Genetischen Institut begonnene Dissertation 1976 ab.

